

II

(Atos não legislativos)

REGULAMENTOS

REGULAMENTO (UE) 2019/1390 DA COMISSÃO

de 31 de julho de 2019

que altera, tendo em vista a adaptação ao progresso técnico, o anexo do 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 2,

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 dos produtos químicos.
- (2) A Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE) elabora orientações harmonizadas e acordadas a nível internacional para o ensaio de produtos químicos para fins regulamentares. A OCDE adota regularmente orientações de ensaio novas e revistas, atendendo aos progressos científicos no domínio em causa.
- (3) A fim de ter em conta o progresso técnico e, sempre que possível, reduzir o número de animais utilizados para fins experimentais, em conformidade com o artigo 13.º, n.º 2, do Regulamento (CE) n.º 1907/2006, importa, após a adoção das respetivas diretrizes de ensaio da OCDE, estabelecer dois novos métodos de ensaio para avaliação da ecotoxicidade e nove novos métodos de ensaio para determinação da toxicidade para a saúde humana, bem como atualizar sete métodos de ensaio. Onze desses métodos dizem respeito a ensaios *in vitro* de irritação ou corrosão cutânea e ocular, sensibilização cutânea, genotoxicidade e efeitos endocrinológicos. As partes interessadas foram consultadas sobre a proposta de alteração.

⁽¹⁾ JO L 396 de 30.12.2006, p. 1.

⁽²⁾ Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão, de 30 de maio de 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) (JO L 142 de 31.5.2008, p. 1).

- (4) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 deve, portanto, ser alterado em conformidade.
- (5) 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 vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

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

Feito em Bruxelas, em 31 de julho de 2019.

Pela Comissão
O Presidente
Jean-Claude JUNCKER

ANEXO

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

(1) na parte B, o capítulo B.4 passa a ter a seguinte redação:

«B.4 TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO/CORROSÃO DÉRMICA

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 404 (2015) da OCDE. As diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos são revistas periodicamente, de modo a assegurar que refletem os melhores dados científicos disponíveis. Na revisão da *Test Guideline* 404 da OCDE, foi prestada particular atenção a possíveis melhorias no que respeita ao bem-estar dos animais e à avaliação de todas as informações existentes sobre o produto químico em estudo, a fim de evitar ensaios desnecessários em animais de laboratório. A versão atualizada da *Test Guideline* 404 da OCDE (originalmente adotada em 1981 e revista em 1992, 2002 e 2015) inclui uma referência ao documento de orientação sobre as abordagens integradas de ensaio e avaliação para irritação/corrosão dérmicas (1), propondo uma abordagem modular aplicável à irritação cutânea e à corrosão cutânea. A IATA descreve vários módulos que agrupam fontes de informação e ferramentas de análise; além disso: i) fornece orientações sobre como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não provenientes de ensaios para a avaliação dos potenciais de irritação cutânea e de corrosão cutânea dos produtos químicos e ii) propõe uma abordagem quando há necessidade de ensaios complementares (1). Quando for apropriado, recomenda-se a aplicação sucessiva (não simultânea) dos três pensos de ensaio ao animal no ensaio *in vivo* inicial.
2. As definições de irritação e corrosão dérmica são estabelecidas no apêndice do presente método de ensaio.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

3. Tendo em conta o interesse científico e o bem-estar dos animais, não devem ser efetuados ensaios *in vivo* até se proceder a uma avaliação de todos os dados disponíveis relevantes para a potencial corrosibilidade/irritabilidade dérmica do produto químico numa análise de ponderação da suficiência da prova, conforme apresentado no Documento de Orientação sobre Abordagens Integradas de Ensaio e Avaliação da Corrosão e Irritação Dérmicas, ou seja, as três partes desta orientação e os módulos correspondentes (1). Sucintamente, na parte 1, os dados existentes são tratados em sete módulos que abrangem dados humanos, dados *in vivo*, dados *in vitro*, dados sobre as propriedades físico-químicas (por exemplo, pH, nomeadamente uma forte acidez ou alcalinidade) e métodos sem ensaios. Na parte 2, é efetuada a análise de ponderação da suficiência da prova. Se esta análise de ponderação da suficiência da prova ainda for inconclusiva, deve passar-se à parte 3, com ensaios adicionais, começando com métodos *in vitro*, sendo os ensaios *in vivo* o último recurso. Esta análise deve, pois, reduzir a necessidade de ensaios *in vivo* para a corrosão/irritação dérmica dos produtos químicos em estudo para os quais já existam dados suficientes provenientes de outros estudos em relação a estes dois fatores.

PRINCÍPIO DO ENSAIO IN VIVO

4. O produto químico em estudo é aplicado em dose única na pele de um animal de experiência; as áreas de pele não tratadas do animal de experiência são utilizadas como controlo. O grau de irritação/corrosão é observado e registado em intervalos determinados e detalhadamente descrito de modo a permitir uma avaliação completa dos efeitos. A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos observados.
5. Os animais que apresentem sinais de sofrimento e/ou dor intensos durante qualquer das etapas do ensaio devem ser abatidos e o produto químico em estudo deve ser classificado de acordo com estas observações. Os critérios para a decisão de abater animais moribundos e animais em grave sofrimento são objeto de um documento de orientação específico (2).

PREPARAÇÃO DO ENSAIO IN VIVO

Seleção de espécies animais

6. O coelho albino é o animal de laboratório mais adequado, devendo ser usados coelhos jovens adultos saudáveis. A utilização de outras espécies deve ser justificada.

Preparação dos animais

7. Aproximadamente 24 horas antes do ensaio, o pelo deve ser removido por corte curto na área dorsal do tronco dos animais. Deve ter-se o cuidado de não ferir a pele do animal e só devem ser usados animais com pele saudável e intacta.
8. Algumas estirpes de coelhos têm tufo denso de pelo, que são mais proeminentes em certas épocas do ano. Estas áreas de crescimento denso de pelo não devem ser utilizadas como local de ensaio.

Condições de alojamento e de alimentação

9. Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério para os coelhos deve ser de 20 °C (± 3 °C). Embora a humidade relativa deva ser de pelo menos 30 % e de preferência não exceder os 70 %, exceto durante o período de limpezas, o valor pretendido deve ser de 50 %-60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Na alimentação, podem ser utilizadas dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Aplicação do produto químico em estudo

10. O produto químico em estudo deve ser aplicado numa pequena área de pele (aproximadamente 6 cm²) e coberta com um penso de gaze, colado com fita adesiva não irritante. Nos casos em que não é possível aplicação direta (por exemplo, líquidos e algumas pastas), o produto químico em estudo deve ser aplicada num penso de gaze, que é, por sua vez, aplicado a pele. Durante o período de exposição, o penso deve estar em contacto com a pele de uma forma ligeiramente solta através de uma ligadura semioclusiva adequada. Se o produto químico em estudo for aplicado num penso, este deve ser mantido sobre a pele de modo a assegurar um bom contacto e uma distribuição uniforme da substância na pele. Deve ser evitado o acesso do animal ao penso e a ingestão ou inalação do produto químico em estudo.
11. Os produtos químicos em estudo líquidos são geralmente utilizados sem diluição. Quando se ensaiam sólidos (que podem ser pulverizados, caso tal seja considerado necessário), o produto químico em estudo deve ser humedecido com a menor quantidade de água (ou, se necessário, com outro excipiente adequado) suficiente para assegurar um bom contacto com a pele. No caso de serem utilizados excipientes que não água, a influência potencial do excipiente na irritação da pele pela substância de ensaio deve ser mínima ou nula.
12. No final do período de exposição, que é normalmente de quatro horas, o produto químico em estudo residual deve ser removido, caso tal seja praticável, utilizando água ou um solvente apropriado, que não altere a resposta ou a integridade da epiderme.

Nível de dosagem

13. Aplica-se ao local de ensaio uma dose de 0,5 ml de líquido ou de 0,5 g de sólido ou pasta.

Ensaio inicial (ensaio *in vivo* de irritação/corrosão dérmica utilizando um animal)

14. No caso de um produto químico em estudo ter sido considerado corrosivo, irritante ou não classificado com base numa análise de ponderação da suficiência da prova ou em ensaios *in vitro* anteriores, não são, em princípio, necessários ensaios *in vivo* adicionais. No entanto, nos casos em que se considere necessária a obtenção de dados adicionais, o ensaio *in vivo* é realizado inicialmente utilizando a seguinte metodologia: aplicação sequencial de, no máximo, três pensos de ensaio ao animal. O primeiro penso é removido após três minutos. Caso não se observe qualquer reação grave na pele, aplica-se um segundo penso num local diferente, que é removido ao fim de uma hora. Se nesta etapa as observações indicarem que se pode aumentar o tempo de exposição para quatro horas em condições não agressivas para o animal, aplica-se um terceiro penso, que é removido após quatro horas, sendo a resposta devidamente graduada.
15. Caso seja observado um efeito corrosivo após qualquer das três exposições sequenciais, o ensaio é imediatamente finalizado. Caso não se observe qualquer efeito corrosivo após a remoção do último penso, o animal é observado durante 14 dias, exceto se se observar corrosão antes do final desse período.
16. Nos casos em que o produto químico em estudo não seja suscetível de provocar corrosão, mas possa ser irritante, deve ser aplicado um único penso a um animal durante quatro horas.

Ensaio de confirmação (ensaio *in vivo* de irritação dérmica com animais adicionais)

17. Se não for observado um efeito corrosivo no ensaio inicial, a resposta irritante ou negativa deve ser confirmada utilizando até dois animais adicionais, cada um com um penso e por um período de exposição de quatro horas. Se for observado um efeito irritante no ensaio inicial, o ensaio de confirmação pode ser efetuado de uma forma sequencial ou através da exposição simultânea de dois animais adicionais. No caso excepcional de não ser efetuado um ensaio inicial, podem tratar-se dois ou três animais com um penso único, que é removido quatro horas após a aplicação. No caso serem utilizados dois animais e ambos apresentarem a mesma resposta, não é necessário efetuar mais ensaios. Caso contrário, o terceiro animal é igualmente sujeito a ensaio. Pode ser necessária a utilização de animais adicionais para confirmar respostas equívocas.

Período de observação

18. O período de observação deve ser suficiente para uma avaliação completa da reversibilidade dos efeitos observados. No entanto, a experiência deve ser interrompida em qualquer altura caso o animal apresente sinais continuados de dor ou sofrimento intensos. Para a determinação da reversibilidade dos efeitos, os animais devem ser observados durante 14 dias após a remoção dos pensos. No caso de se observar reversibilidade antes do final do período de 14 dias, deve interromper-se a experiência.

Observações clínicas e graduação das reações da pele

19. Todos os animais devem ser examinados para sinais de eritema e edema, sendo as respostas avaliadas 60 minutos e 24, 48 e 72 horas após a remoção do penso. No ensaio inicial com um animal, o local de ensaio é igualmente examinado imediatamente após a remoção do penso. As reações dérmicas são graduadas e registadas de acordo com a graduação da tabela *infra*. Caso ocorram danos na pele que não possam ser identificados como irritação ou corrosão após 72 horas, pode ser necessário efetuar observações até ao dia 14 para determinar a reversibilidade dos efeitos. Além da observação de irritação, todos os efeitos tóxicos locais, tais como perda de gordura cutânea e quaisquer efeitos sistémicos nocivos (por exemplo, efeitos em sintomas de toxicidade e efeitos no peso corporal), devem ser descritos e registados pormenorizadamente. Poderá ser efetuado um exame histopatológico para clarificar respostas equívocas.
20. A graduação das respostas dérmicas é necessariamente subjetiva. Para se promover a harmonização da graduação da resposta dérmica e auxiliar os laboratórios de ensaio e as pessoas envolvidas na obtenção e interpretação das observações, o pessoal que executa as observações deve receber formação adequada sobre o sistema de graduação utilizado (ver tabela *infra*). Poderá ser útil a consulta de um guia ilustrado para graduação da irritação dérmica e de outras lesões (3).

DADOS E RELATÓRIOS

21. Os resultados do estudo devem ser resumidos sob a forma de tabela no relatório final de ensaio e devem abranger todos os aspetos descritos no ponto 24.

Avaliação dos resultados

22. Os resultados de irritação dérmica devem ser avaliados conjuntamente com a natureza e a gravidade das lesões e a sua reversibilidade ou ausência de reversibilidade. As respostas individuais não representam um padrão absoluto das propriedades irritantes de um material, já que são também avaliados outros efeitos do material de ensaio. Pelo contrário, os resultados individuais devem ser encarados como valores de referência, que necessitam de ser avaliados conjuntamente com todas as outras observações efetuadas durante o estudo.
23. Deve-se ter em conta a reversibilidade das lesões dérmicas na avaliação da resposta irritante. Nos casos em que ocorram respostas como alopecia (área limitada), hiperqueratose, hiperplasia e descamação persistentes no final do período de 14 dias de observação, o produto químico em estudo deve ser considerada irritante.

Relatório de ensaio

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

Fundamentação lógica do ensaio in vivo

- análise de ponderação da suficiência da prova relativa aos dados de ensaio preexistentes, incluindo os resultados da estratégia de ensaio sequencial;
- descrição dos dados relevantes disponíveis de ensaios anteriores;
- dados obtidos em cada etapa da estratégia de ensaio;
- descrição dos ensaios *in vitro* efetuados, incluindo informações sobre o protocolo, resultados obtidos com substâncias de ensaio/referência;
- análise de ponderação da suficiência da prova para a realização do estudo *in vivo*.

Produto químico em estudo

- substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;
- substância multicomponentes, mistura e substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos (UVCB): caracterização, tanto quanto possível, por identidade química (ver *supra*), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes;
- aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- proveniência, número do lote, se disponíveis;
- tratamento do produto químico em estudo/substância de controlo antes do ensaio, se for o caso;

- estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas;
- condições de armazenagem.

Veículo

- identificação, concentração (se pertinente), volume utilizado;
- justificação do excipiente escolhido.

Animais de ensaio

- espécie/estirpe utilizada, justificação da eventual utilização de outros animais que não coelhos albinos;
- número de animais de cada sexo;
- peso de cada animal no início e no final do ensaio;
- idade no início do estudo;
- origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições de realização do ensaio

- pormenores relativos à preparação da zona de ensaio;
- pormenores relativos aos materiais e técnicas de apósito utilizadas;
- descrição pormenorizada da preparação, aplicação e remoção do produto químico em estudo.

Resultados

- tabelas com a classificação das respostas de irritação/corrosão para cada animal em cada observação;
- descrição de todas as lesões observadas;
- descrição pormenorizada da natureza e grau da irritação ou corrosão observada e de quaisquer observações histopatológicas;
- descrição de quaisquer outros efeitos nocivos locais (por exemplo, perda de gordura cutânea) e efeitos sistémicos, além da irritação ou corrosão dérmica.

Discussão dos resultados

Conclusões

BIBLIOGRAFIA

- (1) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (N.º 203), Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris.
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.
- (3) 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 Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

*Quadro***Graduação de Reações dérmicas****Formação de eritema e escara**

Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (fracamente discernível).....	1
Eritema bem definido.....	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (vermelhidão cor de carne) e formação de escara que impede a graduação do eritema	4

Máximo possível: 4

Formação de edema

Número de edemas.....	0
Edema muito ligeiro (fracamente discernível).....	1
Edema ligeiro (bordos da área bem definida por elevação delineada).....	2
Edema moderado (com uma elevação de aproximadamente 1 mm.....	3
Edema grave (com uma elevação superior a 1 mm e excedendo a área de exposição).....	4

Máximo possível: 4

Poderá ser efetuado um exame histopatológico para clarificar respostas equívocas.

Apêndice

DEFINIÇÕES

Produto químico: uma substância ou mistura.

Irritação dérmica: consiste na produção de danos reversíveis na pele após a aplicação do produto químico em estudo, por um período não superior a quatro horas.

Corrosão dérmica: consiste na produção de danos irreversíveis na pele, nomeadamente necrose visível através da epiderme e que atinge a derme, após a aplicação do produto químico em estudo por um período não superior a quatro horas. São exemplos típicos de reações corrosivas as úlceras, hemorragias e escaras sanguinolentas e, perto do final do período de observação de 14 dias, a descoloração, devido à perda de pigmentação da pele, a formação de zonas de alopecia total e a ocorrência de cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser esclarecidas por métodos histopatológicos.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.»

(2) na parte B, o capítulo B.17 passa a ter a seguinte redação:

«B.17 ENSAIO *IN VITRO* DE MUTAÇÃO GÉNICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS UTILIZANDO OS GENES HPRT E XPRT

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline 476* (2016) da OCDE. Os métodos de ensaio são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. A presente versão revista do método de ensaio B.17 reflete quase trinta anos de experiência com este ensaio e resulta também do desenvolvimento de um novo método distinto consagrado a ensaios de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* utilizando o gene da timidina-cinase. O método B.17 faz parte de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente introduzidas nas orientações da OCDE neste domínio (1).
2. O objetivo do ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* consiste em detetar mutações génicas induzidas por produtos químicos. As linhas celulares utilizadas nestes ensaios apresentam mutações em genes repórteres, nomeadamente o gene endógeno da hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (*Hprt* em células de roedores, *HPRT* em células humanas; coletivamente designados como «gene *Hprt*» e «ensaio HPRT» no presente método de ensaio) e o transgene da xantina-guanina-fosforribosil-transferase (*xprt* ou *gpt*) (referido como «ensaio de XPRT»). Os ensaios de mutação HPRT e XPRT detetam diferentes gamas de ocorrências genéticas. Além dos eventos de mutação detetados pelo ensaio HPRT (por exemplo, substituição de um par de bases, deslocação do quadro de leitura, pequenas supressões e inserções), a localização autossómica do transgene *gpt* pode permitir a deteção de mutações decorrentes de grandes supressões e possivelmente a recombinação mitótica não detetada pelo ensaio HPRT porque o gene *Hprt* está localizado no cromossoma X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Atualmente, o ensaio XPRT é menos utilizado do que o ensaio HPRT para fins normativos.
3. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. Os ensaios realizados *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de ativação metabólica. O sistema exógeno de ativação metabólica não reproduz inteiramente as condições *in vivo*.
5. Deve ter-se o cuidado de evitar condições que conduzam a resultados falsos positivos (ou seja, a possível interação com o sistema de ensaio) não causados pela interação direta entre o produto químico em estudo e o material genético da célula; tais condições incluem variações do pH ou da pressão osmótica (8) (9) (10), interação com os componentes médios (11) (12) ou níveis excessivos de citotoxicidade (13). No ensaio HPRT, é considerada excessiva a citotoxicidade que exceda os níveis de citotoxicidade máxima recomendados, estabelecidos no ponto 19.
6. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações não são necessárias se houver um requisito normativo para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. As células mutantes com deficiências na atividade enzimática de *Hprt* no ensaio HPRT ou na atividade enzimática *xprt* no ensaio XPRT são resistentes aos efeitos citostáticos da 6-tioguanina (TG), análoga da purina. As células que dispõem de *Hprt* (no ensaio HPRT) ou de *Gpt* (no ensaio VPRT) são sensíveis à TG, que causa inibição do metabolismo celular e impede a divisão da célula. Logo, as células mutantes podem proliferar na presença de TG, o que não acontece com as células normais, que contêm a enzima *Hprt* (no ensaio HPRT) ou *Gpt* (no ensaio XPRT).

8. As células em suspensão ou em cultura em monocamada são expostas ao produto químico em estudo, tanto na presença como na ausência de uma fonte exógena de ativação metabólica, (ver ponto 14) por um período apropriado (3-6 horas), sendo depois cultivadas para determinar a citotoxicidade e para permitir a expressão fenotípica antes da seleção do mutante (14) (15) (16) (17). A citotoxicidade é determinada pela sobrevivência relativa (SR), ou seja, a eficiência de clonagem medida imediatamente após o tratamento e ajustada por qualquer perda de células durante o tratamento, em comparação com o controlo negativo (ponto 18 e apêndice 2). As culturas tratadas são mantidas no meio de cultura durante um período suficiente, que varia em função do tipo de célula, a fim de permitir a expressão fenotípica tão boa quanto possível das mutações induzidas (normalmente um mínimo de 7-9 dias). Após a expressão fenotípica, a frequência de mutação é determinada mediante a inoculação de um número conhecido de células num meio que contenha o agente seletivo, para a deteção de colónias mutantes, e num meio sem agente seletivo, para determinar as respetivas eficiências de clonagem (viabilidade). Após um período de incubação apropriado, as colónias são contadas. A frequência de mutação é calculada com base no número de colónias mutantes corrigido pela eficiência de clonagem no momento da seleção de mutantes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Células

9. Os tipos de células utilizados nos ensaios HPRT e XPRT devem ter uma sensibilidade demonstrada aos mutagêneos químicos, uma elevada eficiência de clonagem, um cariótipo estável e uma frequência de mutação espontânea estável. As células mais frequentemente utilizadas para o ensaio HPRT incluem as linhas CHO, CHL e V79 de células de hamsteres chineses, as células L5178Y do linfoma do rato e as células linfoblastóides humanas TK6 (18) (19). As células AS52 derivadas de CHO contendo o transgene *gpt* (e com o gene *Hprt* suprimido) são utilizadas para o ensaio XPRT (20) (21); o ensaio HPRT não pode ser realizado em células AS52 porque o gene *Hprt* foi suprimido. A utilização de outras linhas celulares deve ser justificada e validada.
10. As linhas celulares devem ser periodicamente verificadas quanto à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasmas (22) (23), não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas ou que o número modal de cromossomas se alterou. A duração normal do ciclo celular das células utilizadas no laboratório de ensaio deve ser conhecida e compatível com as características celulares publicadas. Deve também ser verificada a frequência de mutação espontânea no banco de células principal, que não deve ser utilizado se a frequência de mutação não for aceitável.
11. Antes da realização no presente ensaio, as culturas poderão ter de ser limpas de células mutantes eventualmente presentes, por exemplo, através de culturas em meio HAT, para o ensaio HPRT, e MPA, para o ensaio de XPRT (5) (24) (ver apêndice 1). As células limpas podem ser criopreservadas e descongeladas para utilização em trabalhos ulteriores. O material recém-descongelado pode ser utilizado para o ensaio, após o tempo de duplicação normal. Ao realizar o ensaio XPRT, a cultura de rotina de células AS52 deve ser feita em condições que garantam a manutenção do transgene *gpt* (20).

Meios e condições de cultura

12. Devem manter-se as culturas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, atmosfera humidificada com uma concentração de CO₂ de 5 % e temperatura de incubação de 37 °C). As culturas de células devem ser sempre mantidas em condições que assegurem o seu crescimento exponencial. É particularmente importante que sejam escolhidos meios e condições de cultura que garantam um crescimento ótimo das células durante o período de expressão e uma elevada eficiência de clonagem tanto para células mutantes como não mutantes.

Preparação das culturas

13. As linhas celulares são propagadas a partir de culturas de arranque, inoculadas no meio de cultura a uma densidade tal que as células em suspensão ou em monocamadas continuem a crescer exponencialmente durante o período de tratamento e de expressão (deve evitar-se, p. ex., a confluência no caso do crescimento de células em monocamadas).

Ativação metabólica

14. Se forem utilizadas células com capacidade metabólica endógena inadequada, será necessário utilizar sistemas metabolizantes exógenos. O sistema mais geralmente utilizado e que se recomenda por defeito, salvo motivo em contrário, é uma fração pós-mitocondrial reforçada com co-fator (S9) preparada a partir de fígados de roedores (em geral, ratazanas) tratados com agentes de indução enzimática, como, por exemplo, Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) ou uma mistura de fenobarbital e β -naftoflavona (29) (30) (31) (32). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (33) e relevou-se tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (29) (31). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama de 1 % a 2 % (v/v), mas pode ser aumentada para 10 % (v/v) no meio de ensaio final. A classe de substâncias em estudo pode influenciar a escolha do tipo e da concentração do sistema de ativação metabólica exógeno ou do indutor metabólico utilizado (34)(35)(36).

Preparação do produto químico em estudo

15. Os produtos químicos sólidos em estudo devem ser adicionados a solventes adequados e, se necessário, ser diluídos antes do tratamento das células (ver ponto 16). Os produtos químicos líquidos em estudo podem ser adicionados diretamente ao sistema de ensaio e/ou ser diluídos antes de serem utilizados no tratamento do sistema de ensaio. Para o ensaio de produtos químicos gasosos ou voláteis, devem efetuar-se alterações adequadas aos protocolos normalizados, como o tratamento em recipientes de cultura fechados (37) (38). A preparação do produto químico em estudo deve ocorrer imediatamente antes do tratamento, a menos que dados de estabilidade demonstrem que o produto pode ser armazenado.

CONDIÇÕES DE ENSAIO

Solventes

16. O solvente deve ser escolhido de modo a otimizar a solubilidade dos produtos químicos em estudo sem afetar negativamente a realização do ensaio, por exemplo, alterando o crescimento celular, afetando a integridade do produto químico em estudo, reagindo com os recipientes de cultura ou alterando o sistema de ativação metabólica. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente (ou meio de cultura) aquoso. A água e o dimetilsulfóxido, por exemplo, são solventes cujo desempenho é bem conhecido. Em geral, os solventes orgânicos não devem exceder 1 % (v/v) e os solventes aquosos (soluções salinas ou água) não devem exceder 10 % (v/v) no meio de tratamento final. Se forem utilizados solventes cujo desempenho não é bem conhecido (p. ex., etanol ou acetona), devem fornecer-se dados que comprovem a respetiva compatibilidade com os produtos químicos em estudo e com o sistema de ensaio e a inexistência de genotoxicidade à concentração utilizada. Na ausência de dados comprovativos, é importante incluir amostras de controlo não tratadas (ver apêndice 1) para demonstrar que o solvente escolhido não tem efeitos deletérios ou clastogénicos.

Medição da citotoxicidade e escolha das concentrações de tratamento

17. Ao determinar a concentração máxima a ensaiar do produto químico em estudo, devem evitar-se concentrações capazes de gerar respostas positivas falsas, como as que produzam citotoxicidade excessiva (ver ponto 20), precipitações no meio de cultura (ver ponto 21) ou alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (ver ponto 5). Se, ao ser adicionado, o produto químico em estudo causar uma alteração pronunciada do pH do meio, o pH pode ser ajustado por tamponamento do meio de tratamento final, de modo a evitar falsos resultados positivos e manter condições de cultura adequadas.
18. A seleção da concentração baseia-se na citotoxicidade e noutras considerações (ver pontos 20-22). Embora a avaliação da citotoxicidade num ensaio inicial possa ser útil para definir melhor as concentrações a utilizar no ensaio principal, não é necessária. Mesmo no caso de se realizar uma avaliação inicial da citotoxicidade, a determinação da citotoxicidade em cada cultura continua a ser necessária no ensaio principal. A citotoxicidade deve ser avaliada com recurso à RS, ou seja, à eficiência de clonagem (CE) das células, imediatamente após o tratamento, ajustada por qualquer perda de células durante o tratamento, com base na contagem celular, em comparação com a eficiência ajustada de clonagem em controlos negativos (taxa de sobrevivência de 100 %) (ver a fórmula no apêndice 2).

19. Devem ser avaliadas, pelo menos, quatro concentrações de ensaio (não incluindo as amostras de controlo positivo nem as amostras de controlo do solvente) que cumpram os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade adequada, número de células, etc.). Embora seja aconselhável a utilização de culturas replicadas, as culturas únicas são igualmente aceitáveis em todas as concentrações a ensaiar. Os resultados obtidos com as culturas replicadas independentes, a uma dada concentração, devem ser registados separadamente, mas podem ser agrupados para fins de análise de dados (17). No caso dos produtos químicos que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, são normalmente adequadas concentrações espaçadas por um fator de 2 a 3. Quando se observa citotoxicidade, as concentrações escolhidas devem abranger uma gama com início na concentração que produz citotoxicidade e inclui as concentrações às quais se observa pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitos produtos químicos em estudo apresentam curvas concentração-resposta com declive acentuado, pelo que, para obter dados sobre toda a gama de citotoxicidade ou para analisar em pormenor a relação concentração-resposta, pode ser necessário recorrer a concentrações menos espaçadas e a mais de quatro concentrações, em especial nas situações em que for necessário repetir o ensaio (ver ponto 43). A utilização de mais de quatro concentrações pode ser particularmente importante quando se utilizam culturas únicas.

20. Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deverá atingir um valor entre 20 % e 10 % RS. Deve ser-se cauteloso na interpretação de resultados positivos que se obtêm apenas a 10 % ou menos (ver ponto 43).

21. No caso de produtos químicos pouco solúveis não-citotóxicos a concentrações inferiores à concentração insolúvel mínima, a maior concentração analisada deve gerar, no final do tratamento com o produto químico em estudo, turbidez ou um precipitado visível a olho nu ou com auxílio de um microscópio invertido. Mesmo no caso de se observar citotoxicidade acima da menor concentração insolúvel, é conveniente ensaiar uma única concentração que produza turbidez ou um precipitado visível, devido aos efeitos falsos que possam ser induzidos pelo precipitado. À concentração que produz um precipitado, deve assegurar-se que este não interfere com a realização do ensaio. Neste contexto, pode ser útil determinar a solubilidade no meio de cultura antes do ensaio.

22. Se não se observar precipitação nem citotoxicidade condicionante, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (39) (40). Se o produto químico em estudo não for de composição definida – caso, p. ex., de uma substância de composição desconhecida ou variável, de produtos de reação complexos ou de materiais biológicos (UVCB) (41), de extratos ambientais, etc. –, a concentração de topo poderá ter de ser mais elevada (p. ex., 5 mg/ml) na ausência de citotoxicidade suficiente, para aumentar a concentração de cada um dos componentes. Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (42).

Controlos

23. Para cada uma das condições experimentais, devem também realizar-se controlos negativos paralelos (ver ponto 16), em que as células são expostas apenas ao solvente e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal.

24. São necessários controlos positivos para demonstrar a capacidade do laboratório para identificar mutagénios nas condições do protocolo de ensaio, bem como a eficácia do sistema exógeno de ativação metabólica, se pertinente. O quadro 1 apresenta exemplos de produtos químicos de controlo positivo. Se tal se justificar, podem utilizar-se outras substâncias de controlo positivo. Dado que os ensaios de toxicidade genética *in vitro* em células de mamíferos estão suficientemente normalizados, podem realizar-se ensaios que utilizem tratamentos com ou sem ativação metabólica exógena utilizando apenas um controlo positivo que necessite de ativação metabólica. Neste caso, a resposta de controlo positivo única demonstrará a atividade do sistema de ativação metabólica e a capacidade de resposta do sistema de ensaio. Cada controlo positivo deve ser utilizado numa ou mais das concentrações a que se prevê um aumento detetável e reprodutível relativamente à base, a fim de demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio e a resposta não deve ser comprometida por uma concentração de citotoxicidade superior aos limites especificados no presente método de ensaio (ver ponto 20).

Quadro 1

Substâncias de referência recomendadas para a avaliação da competência do laboratório e para a seleção dos controlos positivos

Condição de ativação metabólica	Locus	Substância e n.º CAS
Ausência de ativação metabólica exógena	Hprt	Metanossulfonato de etilo [n.º CAS 62-50-0] Etilnitrosureia [n.º CAS 759-73-9] 1-Óxido de 4-nitroquinolina [número CAS 56-57-5]
	xprt	Estreptonigrina (n.º CAS 3930-19-6) Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7]
Presença de ativação metabólica exógena	Hprt	3-Metilcolantreno [n.º CAS 56-49-5] 7,12-Dimetilbenzantraceno [n.ºCAS 57-97-6] Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8]
	xprt	Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8]

PROCEDIMENTO

Tratamento com o produto químico em estudo

25. As células em proliferação são expostas ao produto químico em estudo na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica. A exposição deve ter uma duração adequada (normalmente, é adequada uma duração de 3 a 6 horas).
26. O número mínimo de células utilizado para cada cultura de ensaio (controlada e tratada), em cada fase do ensaio, deve basear-se na frequência de mutação espontânea. Uma orientação geral consiste em tratar e transferir células suficientes para manter 10 mutantes espontâneos em todas as culturas em todas as fases do ensaio (17). A frequência de mutação espontânea é, em geral, entre 5 e 20×10^{-6} . Para uma frequência de mutação espontânea de 5×10^{-6} e para manter um número suficiente de mutantes espontâneos (10 ou mais), mesmo para culturas expostas a concentrações que provoquem 90 % de citotoxicidade durante o tratamento (10 % RS), será necessário tratar, pelo menos, 20×10^6 células. Além disso, deve ser cultivado um número suficiente de células (nunca inferior a 2 milhões) durante o período de expressão e incubadas em placas para seleção de mutantes (17).

Período de expressão fenotípica e medição da frequência de mutação

27. Após o período de exposição, as células são cultivadas para permitir a expressão fenotípica das mutações. Regra geral, um mínimo de 7 a 9 dias é suficiente para permitir a expressão fenotípica quase ótima dos mutantes Hprt e xprt recentemente induzidos (43) (44). Durante este período, as células são regularmente subcultivadas, a fim de serem mantidas em crescimento exponencial. Após a expressão fenotípica, as células são incubadas em placas em meio com e sem agente seletivo (6-tioguanina) para determinação do número de mutações e da eficiência de clonagem no momento da seleção, respetivamente. Esta incubação em placas pode ser realizada usando pratos para monocamada ou placas de microcamada para células em suspensão. Para a seleção de mutantes, as células devem ser incubadas em placas a uma densidade que garanta uma taxa de mutação ótima (ou seja, que evite a cooperação metabólica) (17). As placas são incubadas durante um período adequado para potenciar o crescimento das colónias (por exemplo, 7-12 dias) e são contadas. A frequência de mutação é calculada com base no número de colónias mutantes corrigido pela eficiência de clonagem no momento da seleção de mutantes (ver fórmulas no apêndice 2).

Competência técnica do laboratório

28. A fim de comprovar que possui experiência suficiente na realização do ensaio antes de passar a utilizar este método em ensaios de rotina, o laboratório deve ter efetuado uma série de experiências com substâncias de referência positivas que ajam por diferentes mecanismos (pelo menos uma ativa com e outra ativa sem ativação metabólica, sendo as substâncias correspondentes selecionadas da lista constante do quadro 1), bem como várias amostras de controlo negativas (utilizando vários solventes/excipientes). As respostas observadas às amostras de controlo positivas e negativas devem ser corroboradas por referências bibliográficas. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos como se refere nos pontos 30 a 33.
29. Deve ser investigada uma seleção de substâncias de controlo positivo (ver quadro 1 do ponto 25), com e sem ativação metabólica, a fim de demonstrar a sua competência na deteção de produtos químicos mutagénicos, para determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica e demonstrar a adequação das condições de crescimento das células durante o tratamento, da expressão fenotípica, da seleção de mutantes e dos métodos de contagem. A gama de concentrações das substâncias selecionadas deve ser escolhida de forma a proporcionar aumentos reprodutíveis e dependentes da concentração, relativamente ao nível de fundo, que permitam demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio.

Dados históricos de controlo

30. O laboratório deve elaborar:
- um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos;
 - um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos (amostras não tratadas, solvente).
31. Ao obter os primeiros dados para um historial de distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo publicados, caso existam (22). À medida que forem sendo adicionados mais dados experimentais à distribuição dos controlos, os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % daquela distribuição (17) (45) (46).
32. A base de dados históricos de controlo negativo deve ser inicialmente constituída por um mínimo de 10 experiências, embora de preferência, seja constituída por, pelo menos, 20 experiências efetuadas em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo – por exemplo, gráficos C ou gráficos de barras (47) –, para identificar a variabilidade dos seus dados de controlo positivo e de controlo negativo e demonstrar que o laboratório domina a metodologia (46). Encontram-se na bibliografia (45) outras recomendações sobre a forma de obter e utilizar os dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação para um determinado ensaio).
33. Os dados de controlo negativo devem consistir em frequências mutantes em culturas únicas ou, de preferência, replicadas, conforme descrito no ponto 23. Os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos da distribuição da base de dados históricos de controlo negativo do laboratório (17) (45) (46). Os dados do controlo negativo realizado em paralelo que se situem fora dos limites de controlo de 95 % são aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlo se não forem valores extremos e ainda se houver indícios de que o sistema de ensaio está «sob controlo» (ver *supra*) e não houver indícios da existência de erros humanos ou técnicos.
34. Quaisquer alterações do protocolo experimental devem ser ponderadas em função da sua coerência com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. As incoerências de monta devem conduzir à constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

DADOS E RELATÓRIOS

Apresentação dos resultados

35. A apresentação dos resultados deve incluir todos os dados necessários para calcular a citotoxicidade (expressa em RS). Os dados, tanto para as culturas tratadas como para as de controlo, devem incluir o número de células no final da exposição, o número de células incubadas em placas imediatamente após o tratamento e o número de contagens de colónias (ou número de poços sem colónias, para o método micropoços). A RS para cada cultura deve ser expressa em percentagem em relação à amostra de controlo do solvente ensaiada em paralelo (ver definições no apêndice 1).
36. A apresentação dos resultados deve incluir também todos os dados necessários para calcular a frequência de mutação. Os dados das culturas tratadas e das culturas de controlo devem incluir: (1) o número de células incubadas em placas com e sem agente seletivo (no momento em que as células são colocadas em placas para seleção mutante) e (2) o número de colónias contadas (ou o número de poços sem colónias no método de micropoços) nas placas, com e sem agente seletivo. A frequência de mutação é calculada com base no número de colónias mutantes (em placas com agente seletivo) corrigido pela eficiência de clonagem (a partir das placas sem agente seletivo). A frequência de mutação deve ser expressa em número de células mutantes por milhão de células viáveis (ver definições no apêndice 1).
37. Devem ser fornecidos dados individuais das culturas. Os dados devem ser fornecidos por cultura e resumidos em quadros.

Critérios de aceitabilidade

38. A aceitação do ensaio baseia-se nos seguintes critérios:
 - Um controlo negativo realizado em paralelo é considerado aceitável para inclusão na base de dados históricos de controlo negativo do laboratório, nos termos descritos no ponto 33.
 - As amostras de controlo positivo (ver ponto 24) devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo relativamente ao controlo negativo em paralelo.
 - Foram ensaiadas duas condições experimentais (com e sem ativação metabólica), a menos que tenha sido possível obter resultados positivos numa (ver ponto 25).
 - É analisável um número adequado de células e concentrações (pontos 25, 26 e 19).
 - Os critérios para a seleção da concentração de topo são coerentes com os descritos nos pontos 20, 21 e 22.

Avaliação e interpretação dos resultados

39. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se, em qualquer das condições experimentais examinadas:
 - pelo menos uma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,
 - o aumento, avaliado com base numa análise de tendências adequada, for dependente da concentração,

- nenhum dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 33).

Se todos estes critérios estiverem preenchidos, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir mutações génicas em células de mamífero cultivadas no presente sistema de ensaio. As referências bibliográficas (46) (48) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

40. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, em todas as condições experimentais examinadas:

- nenhuma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo paralelo,
- não se observar qualquer aumento dependente da concentração, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada;
- todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 33).

Nesse caso, o produto químico em estudo não é considerado passível de induzir mutações génicas em culturas de células de mamíferos neste sistema de ensaio.

41. Não há qualquer exigência concreta para a verificação de uma resposta inequivocamente positiva ou negativa.
42. No caso de a resposta não ser inequivocamente positiva ou negativa como atrás descrito, ou para estabelecer a importância biológica do resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou numa investigação complementar. Pode ser útil um ensaio de repetição, eventualmente com alteração das condições experimentais (intervalo diferente entre as concentrações ou outras condições de ativação metabólica — p. ex., concentração ou origem do S9).
43. Em casos raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitirão concluir por um resultado positivo ou negativo. Assim, deve concluir-se que a resposta do produto químico em estudo é ambígua (interpretada como igualmente suscetível de ser positiva ou negativa).

Relatório de ensaio

44. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;
- estabilidade, se conhecida;
- solubilidade e estabilidade no solvente, se conhecidas;
- medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas dos componentes.

Solvente

- justificação da escolha;
- percentagem no meio de cultura final.

Células

Para as culturas principais de laboratório:

- tipo e fonte das linhas celulares;
- número de passagens, se disponível, e histórico no laboratório;
- características do cariótipo e/ou número modal de cromossomas.
- métodos de manutenção das culturas celulares;
- ausência de micoplasma;
- tempo de duplicação celular.

Condições de realização do ensaio

- justificação para a seleção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade;
- composição dos meios, concentração de CO₂, nível de humidade;
- concentração do produto químico em estudo, expressa em concentração final no meio de cultura (p. ex., µg ou mg/ml ou mM do meio de cultura);

- concentração (e/ou volume) de solvente e de produto químico em estudo adicionado ao meio de cultura;
- temperatura de incubação;
- tempo de incubação;
- duração do tratamento;
- densidade celular durante a exposição;
- tipo e composição do sistema de ativação metabólica (fonte de S9, método de preparação da mistura de S9, concentração ou volume da mistura de S9 e de S9 no meio de cultura final, controlos de qualidade do S9); substâncias de controlo positivo e negativo, concentrações finais para cada condição de tratamento;
- duração do período de expressão (incluindo o número de células inoculadas e os calendários de subcultura e de alimentação, quando aplicável),
- identidade do agente seletivo e respetiva concentração;
- critérios de aceitabilidade dos ensaios;
- métodos utilizados para a enumeração dos números de células mutantes e viáveis,
- métodos de medição da citotoxicidade;
- outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade e ao método utilizado;
- duração dos períodos de incubação após a colocação em placas;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;
- métodos utilizados para determinar o pH, a pressão osmótica e a precipitação.

Resultados

- número de células expostas e número de células subcultivadas para cada cultura;
- medições de citotoxicidade e outras observações, se for caso disso;
- sinais de precipitação e instante da determinação;

- número de células colocadas em placas em meio seletivo e não seletivo;
- número de colónias em meio não seletivo, número de colónias resistentes em meio seletivo e frequências de mutação conexas;
- relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;
- dados (concentrações e solventes) relativos às amostras de controlo negativo (solvente) e de controlo positivo, ensaiadas em paralelo;
- dados históricos relativos aos controlos positivos e negativos (solvente), com as respetivas gamas, valor médio e desvio-padrão e intervalo de confiança (por exemplo, 95 %), bem como o número de dados;
- análises estatísticas (para culturas individuais e replicados agrupados, se for caso disso) e valores p, caso existam.

Discussão dos resultados.

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.
- (3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen. Res.*, 4, 394-403.
- (5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121-128.
- (6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235-239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17-36.
- (8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.

- (9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- (12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177-183.
- (13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 5841-256.
- (14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- (15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
- (16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
- (17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- (19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- (20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.
- (21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616-9620.

- (22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscrito em preparação).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.
- (25) Natarajan A.T., Bates A.D., Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.
- (27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.
- (28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and 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.
- (32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and 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.
- (33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponível em: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cy Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

- (35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Mammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7-18.
- (36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, 4, 7-18.
- (37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooney 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, pp. 91-103.
- (38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and 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. Mutagen.*, 5, 795-801.
- (39) OCDE (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Disponível a pedido da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos.
- (40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36-43.
- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Disponível em: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].
- (43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), *Mutation, Res.*, 59, 109-118.
- (44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., e Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation, Res.*, 1335(2):121-8.
- (45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87-90.
- (46) OCDE (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Amostra de controlo do solvente: termo geral que define as culturas de controlo tratadas apenas com o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo.

Amostra de controlo não tratada: cultura não sujeita a qualquer tratamento (com o produto químico em estudo ou solvente), mas processada simultaneamente e do mesmo modo que as culturas tratadas com o produto químico em estudo.

Citotoxicidade: para efeitos dos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio, a citotoxicidade é definida como uma redução da sobrevivência relativa das células expostas comparativamente com o controlo negativo (ver ponto específico).

Concentrações: refere-se às concentrações finais do produto químico em estudo no meio de cultura.

Eficiência de clonagem: a percentagem de células incubadas em placas em baixa densidade que consegue originar uma colónia que pode ser contada.

Fração S9 de fígado: sobrenadante após centrifugação do homogeneizado hepático a 9 000 g (extrato hepático em bruto).

Frequência de mutação (MF): número de colónias mutantes observadas dividido pelo número de células incubadas em placas em meio seletivo, corrigido pela eficiência de clonagem (ou viabilidade) no momento da seleção.

Genotóxico: termo geral que abrange todos os tipos de danos ao ADN ou aos cromossomas, incluindo quebra do ADN, aduções, rearranjos, mutações, aberrações cromossômáticas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossômicos estáveis.

Meio HAT: meio que contém hipoxantina, aminopterina e timidina, utilizado para limpeza de mutantes Hprt.

Meio MPA: meio que contém xantina, adenina, timidina, aminopterina e ácido microfenólico, utilizado para limpeza de mutantes xprt.

Mistura S9: mistura de fração S9 de fígado e dos cofatores necessários à atividade enzimática metabólica.

Mutação para diante: mutação genética do tipo parental para a forma mutante que causa uma alteração ou perda de atividade enzimática da função da proteína codificada.

Mutagêneos por deslocação do quadro de leitura: produtos químicos que causam a adição ou supressão de um par de bases ou de uma sequência de pares de bases do ADN.

Mutagêneos por substituição de um par de bases: produtos químicos que causam a substituição de pares de bases do ADN.

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

Período de expressão fenotípica: o período após o tratamento durante o qual a modificação genética é fixada no genoma e os produtos dos genes inalterados se esgotam ao ponto de alterar o carácter fenotípico.

Produto químico uma substância ou mistura. Sobrevivência relativa (SR): a SR é utilizada para medir a citotoxicidade relacionada com a exposição. a SR é a eficiência de clonagem (CE) de células incubada em placas imediatamente após a exposição, ajustada por qualquer perda de células durante a exposição, em comparação com a eficiência de clonagem em controlos negativos (com uma taxa de sobrevivência de 100 %).

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Recombinação mitótica: durante a mitose, a recombinação entre cromátídeos homólogos, eventualmente resultante na indução de quebras em cadeias duplas do ADN ou numa perda de heterozigotia.

UVCB: substâncias químicas de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos.

Apêndice 2

FÓRMULAS PARA A AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO

A citotoxicidade é avaliada pela sobrevivência relativa, ou seja pela eficiência de clonagem (CE) de células incubada em placas imediatamente após a exposição, ajustada por qualquer perda de células durante a exposição, em comparação com a eficiência de clonagem ajustada em controlos negativos (com uma taxa de sobrevivência de 100 %) (ver fórmula RS *infra*).

A CE ajustada para uma cultura tratada pelo produto químico em estudo é calculada do seguinte modo:

$$\text{CE ajustada} = \frac{\text{Número de células no final do tratamento}}{\text{Número de células no início do tratamento}}$$

Para uma cultura tratada pelo produto químico em estudo, a RS é calculada do seguinte modo:

$$\text{RS} = \frac{\text{CE ajustada na cultura tratada}}{\text{CE ajustada na controlo com solvente}} \times 100$$

A frequência de mutação é a eficiência de clonagem de colónias mutantes num meio seletivo dividida pela eficiência de clonagem num meio não seletivo medido para a mesma cultura no momento da seleção.

$$\text{Frequência de mutação} = \frac{\text{Eficiência de clonagem de colónias mutantes num meio seletivo}}{\text{Eficiência de clonagem num meio não seletivo}}$$

Se forem utilizadas placas para a eficiência de clonagem:

CE = número de colónias/número de células incubadas em placas.

Quando forem utilizadas placas de micropoços para a eficiência de clonagem:

O número de colónias por poço nas placas de micropoços segue uma distribuição de Poisson.

Eficiência de clonagem = $-\text{LnP}(0)$ / número de células incubadas por poço

Em que $-\text{LnP}(0)$ é o número provável de poços vazios de entre os poços inoculados e é descrito pela seguinte fórmula:

$\text{LNP}(0) = -\text{Ln}(\text{número de poços vazios/número de poços inoculados})$.

(3) Na parte B, o capítulo B.22 passa a ter a seguinte redação:

«B.22 ENSAIO DE LETALIDADE DOMINANTE NO ROEDOR

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 478 (2016) da OCDE. Os métodos de ensaio são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. A presente versão alterada do método de ensaio reflete mais de trinta anos de experiência com este ensaio e o potencial de integração ou de combinação deste ensaio com outros ensaios de toxicidade, como estudos de desenvolvimento, toxicidade reprodutiva ou genotoxicidade; no entanto, devido às suas limitações e à utilização de um grande número de animais, este ensaio não deve ser utilizado como método principal, mas sim como um método de ensaio suplementar, que apenas pode ser utilizado quando não houver alternativa para as exigências normativas. A combinação de ensaios de toxicidade pode poupar um grande número de animais de serem utilizados em ensaios de toxicidade. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente introduzidas nas orientações da OCDE neste domínio (1).
2. O objetivo do ensaio de letalidade dominante (DL) consiste em verificar se os produtos químicos produzem mutações resultantes de aberrações cromossômicas nas células germinais. Além disso, o ensaio de letalidade dominante tem importância para a avaliação da genotoxicidade, porquanto, embora possam variar consoante as espécies, os fatores do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN estão ativos e contribuem para a resposta. A indução de uma mutação de DL após exposição ao produto químico em estudo indica que o produto químico afetou o tecido germinal do animal de ensaio.
3. As mutações de DL provocam a morte do embrião ou do feto. A indução da mutação de DL após exposição ao produto químico em estudo indica que o produto químico afetou as células germinais do animal de ensaio.
4. Um ensaio de DL é útil para confirmar os resultados positivos de ensaios com parâmetros somáticos *in vivo* e constitui um parâmetro relevante para a previsão do perigo/risco para o ser humano de doenças genéticas transmitidas através da linha germinal. Contudo, este ensaio requer um grande número de animais e muita mão de obra; por isso, é muito oneroso e demorado. Dado que a frequência espontânea das mutações letais dominantes é bastante elevada, a sensibilidade do ensaio para deteção de ligeiros aumentos da frequência das mutações é geralmente limitada.
5. Os termos-chave são definidos no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

6. O presente ensaio utiliza, normalmente, ratos (2) (3) (4), mas, em alguns casos, podem ser adequadas outras espécies, como as ratazanas (5) (6) (7) (8), mediante justificação científica. De modo geral, as DL são resultado de aberrações cromossômicas graves (anomalias estruturais e numéricas) (9) (10) (11), mas não podem ser excluídas as mutações génicas. Uma mutação de DL é uma mutação que ocorre numa célula germinal *per se* ou, após a fertilização, nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário, não causa lesões no gâmeta, mas é letal para o ovo fecundado ou para o embrião em desenvolvimento.
7. Cada macho é acasalado sequencialmente com fêmeas virgens a intervalos adequados. O número de acasalamentos após tratamento depende do objetivo final do estudo de DL (ponto 23) e deve assegurar que todas as fases da maturação de células germinais masculinas sejam avaliadas para DL (12).
8. Caso existam provas de que o produto químico em estudo ou o(s) seu(s) metabolito(s) não atingem o testículo, o presente ensaio não é apropriado.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

9. Em geral, os animais machos são expostos ao produto químico em estudo por uma via de exposição adequada e acasalados com fêmeas virgens não tratadas. Podem ser testados diferentes tipos de células germinais com recurso a intervalos de acasalamento sequenciais. Decorrido um período adequado após o acasalamento, as fêmeas são eutanasiadas e os seus úteros examinados para determinar o número de implantes e de embriões vivos e mortos. A letalidade dominante de um produto químico em estudo é determinada por comparação dos implantes vivos por fêmea do grupo tratado com os implantes vivos por fêmea do grupo de controlo do excipiente/solvente. O aumento do número de implantes mortos por fêmea do grupo tratado em relação ao número de implantes mortos por fêmea do grupo de controlo reflete as perdas após a implantação induzidas pelo produto químico em estudo. Estas perdas são calculadas determinando a proporção de implantes mortos no total de implantes do grupo tratado, comparativamente com a proporção de implantes mortos no total de implantes no grupo de controlo. As perdas antes da implantação podem ser estimadas por comparação dos corpos lúteos menos os implantes totais ou o total de implantes por fêmea do grupo tratado e do grupo de controlo.

VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA DO LABORATÓRIO

10. A competência para ensaio deve ser estabelecida mediante a demonstração da capacidade de reproduzir as frequências de letalidade dominante a partir de dados publicados – por exemplo, (13) (14) (15) (16) (17) (18) – com substâncias de controlo positivo (incluindo respostas fracas), como as constantes do quadro 1, e controlos do veículo e a obtenção de frequências de controlo negativas coerentes (ver referências *supra*) ou com o histórico de distribuição do controlo do laboratório, se disponível.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações*Seleção de espécies animais*

11. Devem ser utilizados animais saudáveis, das espécies de laboratório mais comuns, que tenham atingido a maturidade sexual. Geralmente são utilizados ratos, embora também possam ser adequadas ratazanas. Pode utilizar-se qualquer outra espécie adequada de mamífero, se o relatório fornecer uma justificação científica.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

12. No caso dos roedores, a temperatura do biotério deve ser de 22 °C (± 3 °C). Idealmente, a humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 40 %, no mínimo, e um valor máximo que, de preferência, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. Se o produto químico em estudo for administrado pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Antes do tratamento ou do acasalamento, os roedores devem ser alojados em pequenos grupos (não mais de cinco) do mesmo sexo – caso não se prevejam ou observem comportamentos agressivos –, de preferência em gaiolas sólidas com um enriquecimento ambiental adequado. Os animais podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico.

Preparação dos animais

13. Distribuem-se aleatoriamente animais saudáveis e sexualmente maduros, machos e fêmeas, pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Os animais são identificados de forma inequívoca, utilizando um método humano minimamente invasivo (p. ex., anilhagem, marcação, *microchip* ou identificação biométrica, mas não entalhe de orelhas nem amputação de falanges), e são aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Devem ser evitadas contaminações cruzadas pelo produto químico de controlo positivo e pelo produto químico em estudo. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima e não deve exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

14. Os produtos químicos em estudo na forma sólida devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou veículos adequados, ou misturados na dieta ou na água potável antes da administração aos animais. Os produtos químicos em estudo no estado líquido podem ser adicionados diretamente aos sistemas em estudo e/ou diluídos antes da administração. No caso das exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, consoante as respetivas propriedades físico-químicas. Devem utilizar-se preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e determinem as condições de armazenagem adequadas.

Condições de ensaio*Solvente/veículo*

15. O solvente/veículo não deve produzir efeitos tóxicos nos volumes utilizados e não devem existir indícios de reação química com o produto químico em estudo. A eventual utilização de solventes/veículos menos habituais deve ser fundamentada por dados de referência que indiquem serem compatíveis. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso. A água, o soro fisiológico, uma solução de metilcelulose, uma solução de sal de sódio de carboximetilcelulose, o azeite e o óleo de milho constituem exemplos de solventes/veículos compatíveis de utilização comum.

Amostras de controlo positivo

16. Devem ser sempre utilizados animais de controlo positivo em paralelo, a menos que o laboratório tenha demonstrado competência na realização do ensaio e o tenha utilizado regularmente no passado recente (nos últimos 5 anos, por exemplo). Não é, contudo, necessário tratar os animais de controlo positivo pela mesma via que os animais que recebem o produto químico em estudo, nem colher amostras em todos os intervalos de acasalamento. As substâncias de controlo positivo devem ser comprovadamente produtoras de DL nas condições utilizadas para o ensaio. Salvo para o tratamento, os animais dos grupos de controlo devem ser alvo dos mesmos procedimentos que os animais dos grupos tratados.
17. As doses das substâncias de controlo positivo devem ser determinadas de modo a produzirem efeitos fracos ou moderados que avaliem criticamente o desempenho e a sensibilidade do ensaio, mas a produzirem, de forma consistente, efeitos letais dominantes positivos. O quadro 1 apresenta exemplos de substâncias de controlo positivo e de dosagens adequadas.

Quadro 1

Exemplos de substâncias de controlo positivo

Substância [n.º CAS] (número de referência)	Gama de doses eficazes (mg/kg) (espécies de roedores)	Período de administração (dias)
Trietilenomelamina [51-18-3] (15)	0,25 (ratos)	1
Ciclofosfamida [50-18-0] (19)	50-150 (ratos)	5
Ciclofosfamida [50-18-0] (5)	25-100 (ratazanas)	1
Metanossulfonato de etilo [62-50-0] (13)	100-300 (ratos)	5
Acrilamida monómera [79-06-1] (17)	50 (ratos)	5
Clorambucil [305-03-3] (14)	25 (ratos)	1

Controlos negativos

18. Cada amostragem deve incluir animais de controlo negativo, tratados apenas com solvente ou veículo e, em todos os outros aspetos, sujeitos ao mesmo procedimento que os grupos de tratamento (20). Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo escolhido não induz DL nem qualquer outro efeito prejudicial, todas as amostragens devem incluir igualmente animais de controlo sem tratamento, de modo a estabelecer a aceitabilidade do controlo do veículo.

PROCEDIMENTO

Número de animais

19. Cada macho é acasalado sequencialmente, a intervalos adequados previamente determinados (por exemplo, semanais, pontos 21 e 23), de preferência com uma fêmea virgem. O número de machos por grupo deve ser predeterminado de forma a ser suficiente (em combinação com o número de fêmeas acasaladas a cada intervalo de acasalamento) para assegurar a representatividade estatística necessária para detetar pelo menos uma duplicação na frequência de DL (ponto 44).
20. O número de fêmeas por intervalo de acasalamento deve também ser predeterminado pelos cálculos de representatividade estatística de modo de permitir a deteção de, pelo menos, uma duplicação na frequência de DL (ou seja, fêmeas prenhes em número suficiente para a obtenção de, pelo menos, 400 implantes totais) (20) (21) (22) (23) e a probabilidade de, pelo menos, um implante morto por unidade de análise (ou seja, o grupo de acasalamento por dose) (24).

Período de administração e intervalo de acasalamento

21. O número de intervalos de acasalamento após o tratamento é determinado pelo calendário deste e deve assegurar que todas as fases da maturação de células germinais masculinas são avaliadas para indução de DL (12) (25). No caso de um tratamento único com, no máximo, cinco administrações de doses diárias, devem realizar-se, após a última destas, acasalamentos de 8 ratos ou 10 ratazanas com intervalos semanais. Em caso de administração de doses múltiplas, o número de intervalos de acasalamento pode ser reduzido proporcionalmente ao aumento do período de administração, mas deve manter-se o objetivo de avaliar todas as fases da espermatogénese (por exemplo, após uma exposição de 28 dias, quatro acasalamentos semanais são suficientes para avaliar todas as fases da espermatogénese no rato). Todos os calendários de tratamento e acasalamento devem ser cientificamente justificados.
22. As fêmeas devem permanecer com os machos durante, pelo menos, um ciclo éstrico (por exemplo, uma semana abrange um ciclo éstrico em ratos e em ratazanas). As fêmeas que não tenham acasalado durante um intervalo de uma semana podem ser utilizadas para um intervalo de acasalamento subsequente. Em alternativa, até à ocorrência do acasalamento, comprovado pela presença de esperma na vagina ou pela presença de um rolhão vaginal.
23. A exposição e o regime de acasalamento utilizados são função do objetivo último do estudo de DL. Se o objetivo for determinar se um determinado produto químico induz mutações de DL *per se*, o método deve consistir em expor todo um ciclo de espermatogénese (p. ex., 7 semanas no rato, 5-7 tratamentos por semana) e acasalar no final. Contudo, se o objetivo for identificar o tipo de células germinais sensíveis para indução de DL, é preferível uma exposição única ou uma exposição de 5 dias, seguida de acasalamento semanal.

Doses

24. Se for realizado um estudo preliminar para avaliação da gama de doses a administrar por não estarem disponíveis dados apropriados de apoio à seleção de doses, esse estudo deve ser efetuado no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma linha celular, o mesmo sexo e o mesmo regime de exposição do estudo principal (26). O estudo deve procurar identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose mais elevada tolerada, durante o período de ensaio, sem sinais de toxicidade limitativa do estudo (p. ex., comportamentos ou reações anormais, ligeira redução do peso corporal ou citotoxicidade no sistema hematopoiético) e sem causar a morte nem sinais de dor, sofrimento ou tensão que levem à eutanásia por meios humanos (27).

25. A DMT também não deve afetar negativamente o êxito do acasalamento (21).
26. Os produtos químicos em estudo com atividade biológica específica em doses baixas não tóxicas (como hormonas e agentes mitogénicos) e os produtos químicos que apresentem saturação de propriedades toxicocinéticas podem ser exceções aos critérios de definição da dosagem e devem ser avaliados caso a caso.
27. Para obter informações sobre a resposta às doses, o estudo completo deve incluir um grupo de controlo negativo e, no mínimo, três níveis de dosagem, separadas por um fator que, em geral, é 2 e não pode ser superior a 4. Se o produto químico em estudo não produzir efeitos tóxicos num estudo de avaliação da gama de doses ou com base em dados existentes, a dose mais elevada administrada de uma só vez deve ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. Se o produto químico em estudo gerar toxicidade, a dose máxima administrada deve ser a DMT e as doses utilizadas devem, de preferência, abranger uma gama compreendida entre a dose máxima e uma dose de toxicidade baixa ou nula. No caso de produtos químicos não tóxicos, a dose máxima para um período de administração igual ou superior a 14 dias é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia e, para um período de administração inferior a 14 dias, a dose máxima é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia.

Administração das doses

28. Na conceção de um ensaio, deve ter-se em mente a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, desde que devidamente justificadas, podem escolher-se, por exemplo, vias de exposição como a alimentação, água de beber, subcutânea, intravenosa, tópica, inalação, oral (por gavagem) ou implantação. Seja qual for, a via escolhida deve garantir a exposição adequada do(s) tecido(s)-alvo. A injeção intraperitoneal não é, em geral, recomendada, uma vez que não se trata de uma via previsível de exposição humana, só devendo utilizar-se com justificação científica específica. Se o produto químico em estudo for misturado nos alimentos ou na água de beber, especialmente no caso de uma dose única, deve prever-se, entre o consumo dos alimentos e da água e o acasalamento, um intervalo suficiente para permitir a deteção dos efeitos (ponto 31). O volume máximo de líquido que pode ser administrado de uma só vez por gavagem ou injeção depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal, exceto no que respeita a soluções aquosas, em que pode ser administrado um máximo de 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes maiores (caso seja permitida pela legislação no domínio do bem-estar dos animais) deve ser justificada. As variações no volume de ensaio devem ser minimizadas mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante em relação ao peso corporal em todas as dosagens.

Observações

29. Os animais de ensaio devem ser sujeitos a exames clínicos gerais, registando-se os sinais clínicos observados pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em conta o período de pico dos efeitos previstos após a exposição. Durante o período de exposição, devem observar-se todos os animais pelo menos duas vezes por dia, para a deteção de sinais de morbilidade e mortalidade. Todos os animais devem ser pesados no início do estudo e, pelo menos, uma vez por semana nos estudos com repetição de dose, bem como aquando da eutanásia. Pelo menos uma vez por semana, devem realizar-se medições do consumo de alimentos. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo desta deve ser medido em cada mudança de água e, pelo menos, uma vez por semana. Os animais que exibam indicadores não letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados antes da conclusão do período de ensaio (27).

Colheita e tratamento de tecidos

30. As fêmeas são eutanasiadas na segunda metade da gravidez, no dia da gestação (GD) 13 no caso dos ratos e no GD 14-15 no caso das ratas. Os úteros são examinados para deteção de efeitos letais dominantes, a fim de determinar o número de implantes, de embriões vivos e mortos e de corpos lúteos.
31. Os cornos uterinos e os ovários são expostos para contagem dos corpos lúteos e os fetos são removidos, contados e pesados. Os úteros devem ser examinados para detetar reabsorções ocultas por fetos vivos e para garantir que todas as reabsorções são enumeradas. É registada a mortalidade fetal. É igualmente registado o número de fêmeas prenhes e o número total de implantações, as perdas antes da implantação e a mortalidade após a implantação (incluindo as reabsorções precoces e tardias). Além disso, os fetos visíveis podem ser conservados no fixador de Bouin durante, pelo menos, 2 semanas, após o que são examinados para deteção de malformações externas graves (28), a fim de se obterem informações adicionais sobre os efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento do agente em estudo.

DADOS E RELATÓRIOS**Tratamento dos resultados**

32. Os resultados devem ser apresentados em quadros que indiquem o número de machos acasalados, o número de fêmeas prenhes e o número de fêmeas não prenhes. Os resultados de cada acasalamento, incluindo a identidade de cada macho e de cada fêmea, são apresentados individualmente. Deve especificar-se, para cada fêmea, o intervalo de acasalamento, a dose dos machos tratados e o número de implantes vivos e implantes mortos.
33. As perdas após a implantação são calculadas determinando a proporção de implantes mortos no total de implantes do grupo tratado, comparativamente com a proporção de implantes mortos no total de implantes no grupo de controlo de veículos/solventes.
34. As perdas antes da implantação são calculadas como a diferença entre o número de corpos lúteos e o número de implantes ou como a diminuição do número médio de implantes por fêmea em relação ao dos acasalamentos de controlo. Se forem avaliadas as perdas antes da implantação, devem apresentar-se os resultados.
35. O fator de letalidade dominante é estimado do seguinte modo: (mortes após a implantação/total de implantações por fêmea) \times 100.
36. Devem ser comunicados os dados relativos à toxicidade e aos sinais clínicos, em conformidade com o ponto 29.

Crítérios de aceitabilidade

37. A aceitabilidade de um ensaio é determinada pelos critérios a seguir enunciados.
 - O controlo negativo em paralelo está de acordo com as normas publicadas para os dados históricos de controlo negativo, bem como com os dados históricos de controlo do laboratório, se disponíveis (ver pontos 10 e 18).
 - Os controlos positivos realizados em paralelo induzem respostas coerentes com as normas publicadas relativas a dados históricos de controlo positivo ou com a base de dados históricos de controlo positivo do laboratório, se disponíveis, e produzem um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo (ver pontos 17 e 18).
 - Foi analisado um número total adequado de implantes e de doses (ponto 20).
 - Os critérios de seleção da dose máxima são coerentes com os descritos nos pontos 24 e 27.

Avaliação e interpretação dos resultados

38. Devem ser analisados pelo menos três grupos tratados, de modo a proporcionar dados suficientes para uma análise da resposta à dosagem.
39. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:
 - pelo menos uma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo;
 - o aumento, avaliado com um ensaio adequado, estiver relacionado com a dose em, pelo menos, uma condição experimental (por exemplo, um intervalo de acasalamento semanal);
 - nenhum dos resultados estiver fora da gama aceitável de dados de controlo negativo ou da distribuição dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (por exemplo, limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), se disponível.

Nesse caso, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir mutações letais dominantes em células germinais dos animais de ensaio. O ponto 44 contém recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados; as referências bibliográficas (20) (21) (22) (24) (29) contêm outras recomendações sobre abordagens estatísticas. Nos testes estatísticos utilizados, um animal deve considerar-se a unidade experimental.

40. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se:
- nenhuma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo;
 - não se observar qualquer aumento relacionado com a doses em nenhuma condição experimental;
 - todos os resultados estiverem dentro da gama aceitável de dados de controlo negativo ou dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (por exemplo, limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), se disponíveis.

Nesse caso, o produto químico em estudo não é considerado passível de induzir mutações letais dominantes em células germinais dos animais de ensaio.

41. As respostas inequivocamente positivas ou inequivocamente negativas não carecem de confirmação.
42. Se a resposta não for inequivocamente negativa nem positiva, e a fim de contribuir para o estabelecimento da relevância biológica de um resultado (por exemplo, um aumento ténue ou no limite), os dados devem ser avaliados por peritos e/ou através de estudos complementares que utilizem os dados experimentais existentes, para determinar, nomeadamente, se o resultado positivo está fora da gama aceitável de dados de controlo negativo ou dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (30).
43. Em casos raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitem concluir um resultado positivo ou negativo, pelo que se considera que o resultado é ambíguo.
44. Os testes estatísticos utilizados devem considerar o animal macho como a unidade experimental. Embora seja possível que os dados relativos à contagem (por exemplo, o número de implantes por fêmea) possam ser objeto de uma distribuição de Poisson e/ou certas proporções (p. ex., proporção de implantes mortos) possam ser distribuídas de forma binomial, é muito frequente os dados encontrarem-se dispersos (31). Por conseguinte, a análise estatística deve começar por efetuar um teste de sobredispersão/subdispersão com recurso a testes de variância, como o teste de variância binomial de Cochran (32) ou o teste $C(\alpha)$ de Tarone para a sobredispersão binomial (31) (33). Se não for detetada qualquer desvio em relação à dispersão binomial, as tendências das proporções das dosagens podem ser testadas utilizando o teste de tendência de Cochran-Armitage (34) e a comparação entre pares com o grupo de controlo pode ser testada com o teste exato de Fisher (35). Do mesmo modo, se se detetar qualquer desvio em relação à dispersão de Poisson, as tendências das contagens podem ser testadas utilizando o teste de regressão de Poisson (36) e as comparações par a par com o grupo de controlo podem ser testadas no contexto do modelo de Poisson, utilizando contrastes par a par (36). Se for detetada sobredispersão ou subdispersão significativa, recomenda-se a utilização de métodos não paramétricos (23) (31). Estes métodos incluem testes de base, como o teste de tendências de Jonckheere-Terpstra (37) e o teste de Mann-Whitney (38) para comparações par a par com o grupo de controlo de veículos/solventes, bem como testes de permutação, reamostragem ou *bootstrap* para tendências e comparações par a par com o grupo de controlo (31) (39).
45. Um ensaio de DL positivo fornece provas da genotoxicidade do produto químico em estudo nas células germinais do macho tratado da espécie de ensaio.
46. A averiguação do facto de os valores observados estarem dentro ou fora da faixa de controlo histórico pode fornecer orientações para a avaliação da significância biológica da resposta (40).

Relatório de ensaio

47. O relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

Síntese.

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;
- estabilidade, se conhecida;
- solubilidade e estabilidade no solvente, se conhecidas;
- medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o caso.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Preparação do produto químico em estudo:

- justificação da escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo, se conhecidas;
- preparação de fórmulas alimentares, na água de beber ou inaláveis;
- determinações analíticas (eventualmente) realizadas a essas fórmulas (por exemplo: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais).

Animais utilizados no ensaio:

- espécie/estirpe utilizada e justificação da escolha;
- número, idade e sexo dos animais;

- proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;
- método de identificação unívoca dos animais;
- para estudos de curta duração: peso individual dos animais machos no início e no final do teste; para estudos de duração superior a uma semana: os pesos durante o estudo e o consumo alimentar. Deve incluir-se, relativamente a cada grupo, a gama de pesos corporais, com a respetiva média e o desvio-padrão.

Condições de realização do ensaio:

- controlos positivos e negativos (veículo/solvente);
- dados do estudo de determinação da gama de dosagem;
- fundamentação da escolha das doses;
- detalhes da preparação do produto químico em estudo;
- elementos relativos à administração do produto químico em estudo;
- justificação da via de administração escolhida;
- métodos de medição da toxicidade para os animais, incluindo, sempre que disponíveis, análises histopatológicas ou hematológicas e a frequência com que foram realizadas observações dos animais e dos respetivos pesos corporais;
- métodos para verificar se o produto químico em estudo atingiu o tecido-alvo ou a circulação geral, caso se obtenham resultados negativos;
- dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos ou na água de beber (ppm) e do consumo, se aplicável;
- elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;
- elementos relativos ao enriquecimento ambiental da gaiola;
- descrição detalhada da exposição e do programa de colheita de amostras e justificação das escolhas feitas;
- método de analgesia;
- método de eutanásia;
- procedimentos para o isolamento e a preservação de tecidos;
- proveniência e números de lote de todos os *kits* e reagentes (quando aplicável);

- métodos de enumeração de DL;
- calendário de acasalamento;
- métodos utilizados para comprovar o acasalamento;
- momento da eutanásia;
- critérios para a contagem dos efeitos de DL incluindo os corpos lúteos, as implantações, as reabsorções as perdas antes da implantação, os implantes vivos e os implantes mortos.

Resultados:

- estado dos animais antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;
- peso corporal dos machos durante o tratamento e os períodos de acasalamento;
- número de fêmeas acasaladas;
- relação dose-resposta, se possível;
- dados históricos e simultâneos sobre o controlo negativo, com as respectivas gama, valor médio e desvio-padrão;
- dados sobre o controlo positivo simultâneo;
- dados apresentados em quadro para cada mãe, incluindo: número de corpos lúteos por mãe, número de implantações por mãe, número de reabsorções e de perdas antes da implantação, número de implantes vivos por mãe, número de implantes mortos por mãe, peso dos fetos;
- os dados supramencionados relativamente a cada período de acasalamento e a cada dose, com frequências de DL;
- métodos estatísticos utilizados e análises estatísticas efetuadas.

Discussão dos resultados.

Conclusão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

- (3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycza, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Peh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group «Dominant» lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, *Arch. Toxicol.*, 39, 173-185
- (4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res.*, 352:159-167.
- (5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48:267-270.
- (6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation Res.*, 397:77-74.
- (7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20:325-329.
- (8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:80-85.
- (9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, 33, 239-249.
- (10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616-624.
- (11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res.*, C 75:112-129.
- (12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169-172.
- (13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21-27.
- (14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167-180.
- (15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371-378.
- (16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303-314.
- (17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35-40.

- (18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- (19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.
- (20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19-30.
- (21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313-318.
- (22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.
- (23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277-288.
- (24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353 - 360.
- (25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417-429.
- (26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313-319.
- (27) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291-306.
- (29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). «Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data», *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- (31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35-58.
- (32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10: 417-451.

-
- (33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.
- (34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.
- (35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston
- (37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.
- (38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York
- (39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- (40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Corpo lúteo: estrutura secretora de hormonas que se forma no ovário, num folículo que libertou um óvulo. O número de corpos lúteos nos ovários corresponde ao número de óvulos libertados.

Intervalo de acasalamento: período transcorrido entre o final da exposição e o acasalamento dos machos tratados. Através do controlo deste intervalo é possível avaliar os efeitos químicos nos diferentes tipos de células germinais. Nos ratos que acasalam durante a 1.^a, 2.^a, 3.^a, 4.^a, 5.^a, 6.^a, 7.^a e 8.^a semanas após o final da exposição, mede os efeitos nos espermatozoides, espermátídios condensados, espermátídios redondos, espermátócitos paquítenos, espermátócitos precoces, espermátogónias diferenciadas, espermátogónias diferenciadoras, e células espermátogónias estaminais.

Mutação letal dominante: mutação que ocorre numa célula germinal ou se fixa após a fertilização e que provoca a morte do embrião ou do feto.

Perdas antes da implantação: diferença entre o número de implantes e o número de corpos lúteos. As perdas antes da implantação podem ser estimadas comparando o número total de implantes por fêmea no grupo tratado e no grupo de controlo.

Perdas após a implantação: proporção de implantes mortos no grupo tratado comparativamente com a proporção de implantes mortos no total dos implantes no grupo de controlo.

Produto químico: uma substância ou mistura

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Taxa de fecundidade: relação entre o número de fêmeas que acasalaram e engravidaram e o número de fêmeas que acasalaram.

UVCB: substâncias químicas de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos.

Apêndice 2

OPORTUNIDADE DA ESPERMATOGÉNESE NOS MAMÍFEROS

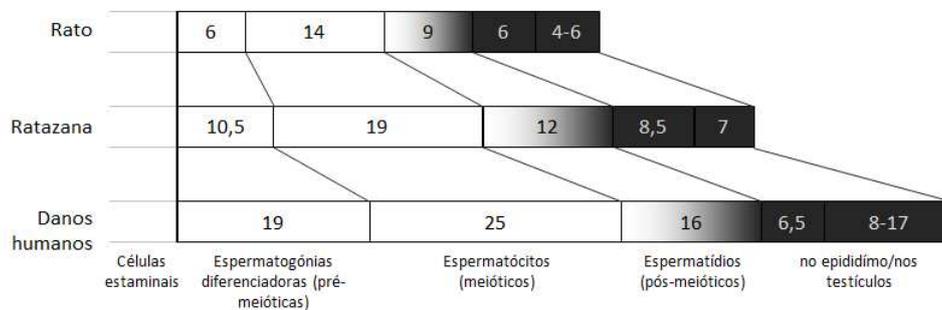


Fig.1: Comparação da duração (dias) do desenvolvimento de células germinais masculinas em ratos, ratazanas e seres humanos. A reparação do ADN não ocorre durante os períodos indicados pelo sombreado.

É apresentado um esquema de espermatogénese nos ratos, ratazanas e seres humanos (extraído de Adler, 1996). As espermatogónias indiferenciadas incluem: espermatogónia A-simples, A-emparelhada e A-alinhada (Hess e de Franca, 2008). As A-simples são consideradas as verdadeiras células estaminais; portanto, para avaliar os efeitos nas células estaminais, devem transcorrer pelo menos 49 dias (no rato) entre a última injeção do produto químico em estudo e o acasalamento.

Referências

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. *Mutat Res*, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.»

(4) Na parte B, o capítulo B.23 passa a ter a seguinte redação:

«B.23 ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM ESPERMATOGÓNIAS DE MAMÍFERO

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline 483 (2016)* da OCDE. Os métodos de ensaio são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. A presente versão alterada do método de ensaio reflete muitos anos de experiência com este ensaio e o potencial de integração ou de combinação deste ensaio com outros estudos de toxicidade ou genotoxicidade. A combinação de estudos de toxicidade tem potencial para reduzir o número de animais utilizados em ensaios de toxicidade. O presente método faz parte de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente introduzidas nas orientações da OCDE neste domínio (1).
2. O objetivo do ensaio *in vivo* de aberrações cromossómicas em espermátogónias de mamífero consiste em identificar os produtos químicos que causam aberrações cromossómicas estruturais nas células espermátogónias de mamíferos (2) (3) (4). Além disso, o presente ensaio é relevante para a avaliação da genotoxicidade, porquanto, embora possam variar consoante as espécies, os fatores do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN estão ativos e contribuem para a resposta. O método do presente ensaio não foi concebido para medir aberrações numéricas e não é normalmente utilizado para esse efeito.
3. O presente ensaio mede aberrações cromossómicas estruturais (tanto cromossómicas como cromatídicas) na divisão das células germinais espermátogónias e, por conseguinte, pressupõe-se que tenha um caráter de previsão da indução de mutações hereditárias nas células germinais.
4. Os termos-chave encontram-se definidos no apêndice.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. O presente ensaio utiliza normalmente roedores mas, em alguns casos, podem ser adequadas outras espécies, mediante justificação científica. As preparações citogenéticas normais dos ensaios com roedores geram metáfases mitóticas (espermátogónias) e meióticas (espermátócitos). As metáfases mitóticas e meióticas são identificadas com base na morfologia dos cromossomas (4). O ensaio citogenético *in vivo* deteta aberrações cromossómicas estruturais nas mitoses espermátogónias. O presente método de ensaio visa outros tipos de células.
6. Para detetar aberrações cromatídicas em células espermátogónias deve examinar-se a primeira divisão mitótica da célula após a exposição, antes de estas aberrações se converterem em aberrações cromossómicas nas divisões celulares subsequentes. Podem obter-se informações adicionais sobre os espermátócitos expostos através da análise cromossómica dos cromossomas meióticos para deteção de aberrações cromossómicas estruturais nas metáfases I e II da diacinese.
7. Nos testículos estão presentes várias gerações de espermátogónias (5), e estes diferentes tipos de células germinais podem ter diferentes sensibilidades ao tratamento químico. Logo, as aberrações detetadas representam uma resposta agregada das várias populações de células espermátogónias expostas. A maioria das células mitóticas nos preparativos do testículo são espermátogónias de tipo B, que têm um ciclo celular de aproximadamente 26 horas (3).
8. O presente ensaio não é apropriado caso existam provas de que o produto químico em estudo ou o(s) seu(s) metabolito(s) não atingem o testículo.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

9. Por norma, os animais são expostos ao produto químico em estudo através de um modo de exposição apropriado. Ao cabo de um período pós-exposição adequado, são eutanasiados. Antes da eutanásia, os animais são tratados com um agente fixador da metáfase (por exemplo, colquicina ou Colcemid®). Seguidamente, são feitas preparações de cromossomas a partir das células germinais e, após serem coradas, as células em metáfase são analisadas para deteção de aberrações cromossómicas.

VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA DO LABORATÓRIO

10. A competência para este ensaio deve ser estabelecida mediante a demonstração da capacidade de reproduzir os resultados esperados em termos de frequências estruturais de aberrações cromossómicas em espermatogónias com substâncias de controlo positivo (incluindo respostas fracas), como as enumeradas no quadro 1, e a obtenção de frequências de controlo negativo coerentes com a gama aceitável de dados de controlo constantes da literatura publicada – p. ex.: (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10) – ou com a distribuição do controlo histórico do laboratório, se disponível.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações*Seleção de espécies animais*

11. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis das espécies de laboratório mais comuns. São normalmente utilizados ratos machos; no entanto, os machos de outras espécies de mamíferos adequadas podem ser utilizados quando cientificamente justificado e para permitir que o ensaio seja realizado em conjugação com outro método de ensaio. A justificação científica para a utilização de outras espécies que não roedores deve constar do relatório.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

12. No caso dos roedores, a temperatura do biotério deve ser de 22 °C (± 3 °C). Embora a humidade relativa ideal seja de 50-60 %, na prática pode descer a 40 %, não devendo exceder 70 %, exceto durante a lavagem do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. Se o produto químico em estudo for administrado pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os roedores devem ser alojados em pequenos grupos (não mais de cinco por gaiola), caso não se prevejam comportamentos agressivos, de preferência em gaiolas sólidas com um enriquecimento ambiental adequado. Os animais podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico.

Preparação dos animais

13. Utilizam-se geralmente animais machos jovens adultos (8-12 semanas de idade no início do tratamento), distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e de tratamento. Os animais são identificados de forma unívoca, utilizando um método que não cause sofrimento e seja o menos invasivo possível (por exemplo: (p. ex., anilhagem, marcação, *microchip* ou identificação biométrica, mas não entalhe de orelhas nem amputação de falanges), e são aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Deve evitar-se a contaminação cruzada pelo controlo positivo e pelo produto químico em estudo. No início do estudo, a variação entre os pesos individuais dos animais deve ser mínima, não devendo exceder ± 20 %.

Preparação das doses

14. Os produtos químicos em estudo na forma sólida devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou veículos adequados, ou misturados na dieta ou na água potável antes da administração aos animais. Os produtos químicos em estudo no estado líquido podem ser adicionados diretamente aos sistemas em estudo e/ou diluídos antes da administração. No caso das exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, consoante as respetivas propriedades físico-químicas. Devem utilizar-se preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e determinem as condições de armazenagem adequadas.

Condições de ensaio — solvente/veículo

15. O solvente/veículo não deve produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas nem reagir quimicamente com o produto químico em estudo. A eventual utilização de solventes/veículos menos habituais deve ser fundamentada por dados de referência que indiquem a sua compatibilidade. Recomenda-se, sempre que possível, a utilização prioritária de solventes/veículos aquosos. A água, o soro fisiológico, uma solução de metilcelulose, uma solução de sal de sódio de carboximetilcelulose, o azeite e o óleo de milho constituem exemplos de solventes/veículos compatíveis de utilização comum. Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo atípico escolhido não induz nenhuma aberração estrutural cromossómica ou outros efeitos deletérios, deve realizar-se um ensaio preliminar destinado a estabelecer a aceitabilidade do controlo do solvente ou veículo.

Amostras de controlo positivo

16. Devem utilizar-se sempre animais de controlo positivo em paralelo, a menos que o laboratório tenha demonstrado competência na realização do ensaio e o tenha utilizado com regularidade no passado recente (nos últimos 5 anos, por exemplo). Se não for incluído um grupo de controlo positivo paralelo, cada experiência deve compreender controlos de contagem (lâminas fixas e não coradas). Estes podem ser realizados mediante a inclusão, no estudo, de amostras de referência adequadas obtidas e armazenadas a partir de um controlo positivo separado, efetuado a intervalos regulares (p. ex., a cada 6-18 meses), no laboratório em que o ensaio é realizado: por exemplo, em testes de competência e, subsequentemente, de uma forma regular, se necessário.
17. As substâncias de controlo positivo devem produzir, com fiabilidade, um aumento detetável na frequência de células com aberrações cromossómicas estruturais em relação ao nível de ocorrência espontânea. A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros, mas também a que as amostras codificadas não sejam imediatamente identificadas pelo operador que procede às leituras. O quadro 1 apresenta exemplos de substâncias de controlo positivas.

*Quadro 1***Exemplos de substâncias de controlo positivas**

Substâncias [N.º CAS] (referência n.º)

Ciclofosfamida mono-hidratada [n.º CAS 50-18-0 (n.º CAS 6055-19-2)] (9)

Ciclo-hexilamina [n.º CAS 108-91-8] (7)

Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7] (6)

Acrilamida monómera [n.º CAS 79-06-1] (10)

Trietilenomelamina [n.º CAS 51-18-3] (8)

Controlos negativos

18. Cada amostragem deve incluir animais de controlo negativo, tratados apenas com solvente ou veículo e, em todos os outros aspetos, da mesma forma que os grupos de tratamento. Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo escolhido não induz aberrações cromossómicas ou outros efeitos deletérios, todas as amostragens devem incluir igualmente animais de controlo sem tratamento, de modo a estabelecer a aceitabilidade do controlo do veículo.

PROCEDIMENTO

Número de animais

19. No início do estudo, as dimensões dos grupos devem ser estabelecidas de forma a assegurar um mínimo de 5 machos por grupo. Este número de animais por grupo é considerado suficiente para assegurar uma representatividade estatística adequada (isto é, permite, em geral, detetar pelo menos uma duplicação da frequência das aberrações cromossómicas com um nível de controlo negativo de 1,0 % ou superior, com uma probabilidade de 80 % a um nível de significância de 0,05) (3) (11). A título de orientação, um estudo realizado com dois tempos de amostragem, três grupos de doses e um grupo de controlo negativo em paralelo, além de um grupo de controlo positivo (cada um com cinco animais), requer 45 animais.

Programa de exposição

20. Os produtos químicos em estudo são geralmente administrados uma vez (ou seja, num único tratamento); podem ser utilizados outros regimes de dosagem, desde que cientificamente justificados.
21. No grupo exposto à dose mais elevada são realizadas duas amostragens após a exposição. Dado que o tempo necessário para a absorção e metabolização do(s) produto(s) químico(s) em estudo, bem como o efeito deste(s) na cinética do ciclo celular, pode afetar o momento ótimo para a deteção de uma eventual aberração cromossómica, recomenda-se a colheita de uma segunda amostra 24 horas após a primeira. Para as doses que não a dose mais elevada, deve prever-se uma amostragem precoce de 24 horas (inferior ou igual à duração do ciclo celular das espermatogónias B, de modo a otimizar a probabilidade de contagem das primeiras metáfases pós-tratamento) após o tratamento, a menos que se saiba que outro intervalo de amostragem é mais adequado e justificado.
22. Podem ser utilizados outros tempos de amostragem. Por exemplo, no caso de produtos químicos que induzam efeitos independentes do fator S, pode ser adequado efetuar amostragens mais precoces (ou seja, menos de 24 horas).
23. O tratamento pode repetir as doses, nomeadamente em conjugação com um ensaio relativo a outros parâmetros que preveja um período de administração de 28 dias (por exemplo, método de ensaio B.58); no entanto, serão necessários outros grupos de animais para ter em conta os diferentes tempos de amostragem. A adequação de tal calendário tem de ser justificada cientificamente, numa base casuística.
24. Antes da eutanásia, os animais são injetados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um produto químico de fixação da metáfase (por exemplo, colquicina ou Colcemid®). As amostras são colhidas a intervalos regulares a partir desse momento. No caso dos ratos e ratazanas, este intervalo é de, aproximadamente, 3 a 5 horas.

Níveis de dosagem

25. Se, por não existirem dados adequados disponíveis que possam servir de orientação na escolha das doses, for realizado um estudo exploratório da gama de dosagens a administrar, este deve ser realizado no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma estirpe e o mesmo regime de exposição a utilizar no estudo principal, de acordo com recomendações para a realização de estudos exploratórios de determinação da gama de dosagens (12). O estudo deve ter por objetivo identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose que, durante o período de ensaio, produz efeitos ligeiramente tóxicos (por exemplo, comportamentos ou reações anormais, ligeira redução do peso corporal ou citotoxicidade do sistema hematopoiético), mas não a morte ou sinais de dor, sofrimento ou tensão que obriguem à eutanásia dos animais (13).
26. A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade nas espermatogónias (por exemplo, redução da taxa de mitose das espermatogónias na primeira e segunda metáfases meióticas; essa redução não deve ser superior a 50 %).

27. Os produtos químicos em estudo com atividade biológica específica em doses baixas não tóxicas (como hormonas e agentes mitogénicos) e os produtos químicos que apresentem saturação de propriedades toxicocinéticas podem ser exceções aos critérios de definição da dosagem e devem ser avaliados caso a caso.
28. Um estudo completo que vise obter informação sobre a resposta às doses deve incluir um grupo de controlo negativo (ponto 18) e, no mínimo, três níveis de dosagem, separados por um fator que, em geral, é 2 e não pode ser superior a 4. Se o produto químico em estudo não produzir efeitos tóxicos num estudo de avaliação da gama de dosagens ou com base em dados existentes, a dose mais elevada administrada de uma só vez deve ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. Contudo, se o produto químico em estudo gerar toxicidade, a dose máxima administrada deve ser a DMT e as dosagens utilizadas devem, de preferência, abranger uma gama compreendida entre a dose máxima e uma dose de toxicidade baixa ou nula. Caso se observe toxicidade no tecido-alvo (testículos) em todas as dosagens ensaiadas, recomenda-se a realização de um estudo complementar com doses não tóxicas. Os estudos destinados a obter informações quantitativas dose-resposta mais precisas podem necessitar de mais grupos de dosagem. Os limites indicados podem variar no caso do estudo de certos tipos de produtos químicos (por exemplo medicamentos para uso humano) abrangidos por exigências específicas. Se o produto químico em estudo produzir toxicidade, deve selecionar-se a dose-limite e duas doses inferiores (conforme descrito *supra*). A dose-limite para um período de administração igual ou superior a 14 dias é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia e, para um período de administração inferior a 14 dias, a dose-limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia.

Administração das doses

29. Na conceção de um ensaio, deve ter-se em mente a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, desde que devidamente justificadas, podem escolher-se vias de exposição como a alimentação, a água de beber, as vias tópica, subcutânea ou intravenosa, a via oral (por gavagem), a via inalatória ou o recurso a implantes. A via escolhida deve garantir a exposição adequada do tecido-alvo. Em geral, a injeção intraperitoneal não é recomendada – a menos que se justifique cientificamente –, uma vez que não é uma via fisiologicamente relevante de exposição humana. Se o produto químico em estudo for misturado na alimentação ou na água de beber, especialmente no caso de dose única, deve prever-se um intervalo suficiente entre a ingestão dos alimentos ou da água e a amostragem, de modo a que os efeitos possam ser detetados (ver ponto 33). O volume máximo de líquido que pode ser administrado de uma só vez por gavagem ou injeção depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal, exceto no que respeita a soluções aquosas, em que pode ser administrado um máximo de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve justificar-se a utilização de volumes maiores (se permitida pela legislação no domínio do bem-estar dos animais). As variações no volume de ensaio devem ser minimizadas mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante em relação ao peso corporal em todas as dosagens.

Observações

30. Os animais de ensaio devem ser sujeitos a exames clínicos gerais, registando-se, pelo menos, uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s), os sinais clínicos observados, tendo em conta o período de pico dos efeitos previstos após a exposição. Pelo menos duas vezes por dia, todos os animais devem ser observados para a deteção de sinais de morbilidade e mortalidade. Todos os animais devem ser pesados no início do estudo, bem como, pelo menos, uma vez por semana (em estudos com doses repetidas) e no momento da eutanásia. Nos estudos que se prolonguem por uma semana ou mais, o consumo de alimentos deve ser medido, pelo menos, uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo desta deve ser medido em cada mudança de água e, pelo menos, uma vez por semana. Os animais que exibam indicadores não letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados antes da conclusão do período de ensaio (13).

Preparação dos cromossomas

31. Imediatamente após a eutanásia, devem ser preparadas suspensões de células germinais, de um ou de ambos os testículos, que serão seguidamente expostas a uma solução hipotónica e fixadas, de acordo com protocolos estabelecidos – por exemplo, (2) (14) (15). As células são depois espalhadas em lâminas e coradas (16) (17). Todas as lâminas devem ser codificadas, para que o operador que procede às leituras não tenha acesso à sua identidade.

Análise

32. Devem ser contabilizadas pelo menos 200 metáfases com uma boa repartição para cada animal (3) (11). Se a frequência de controlo negativo histórico for < 1 %, devem ser contabilizadas mais de 200 células/animal para aumentar a representatividade estatística (3). Devem ser utilizados métodos de coloração que permitam identificar o centrómero.

33. As aberrações cromossómicas e cromatídicas devem ser registadas separadamente e classificadas em subtipos (quebras, intercâmbios). Importa registar as lacunas, que não devem ser tidas em conta, para determinar se um produto químico induz um aumento significativo da incidência de células com aberrações cromossómicas. Os procedimentos em laboratório devem garantir que a análise das aberrações cromossómicas é efetuada por operadores com formação adequada. Dado que os procedimentos de preparação de lâminas resultam frequentemente na rotura de uma determinada proporção de células em metáfase, com perda de cromossomas, as células contabilizadas devem, portanto, conter um número de centrómeros não inferior a $2n \pm 2$, em que n é o número de cromossomas haploides na espécie em causa.
34. Embora o objetivo do ensaio seja a deteção de aberrações cromossómicas estruturais, é importante registar as frequências de células poliploides e células com cromossomas endorreduplicados, caso ocorram (ver o ponto 44).

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

35. Os dados relativos a cada animal devem ser apresentados num quadro. Também para cada animal, devem verificar-se o número de células com aberrações cromossómicas estruturais e o número de aberrações cromossómicas por célula. As aberrações cromatídicas e cromossómicas, classificadas em subtipos (quebras, intercâmbios), devem ser enumeradas separadamente, com os respetivos números e frequências, para os grupos experimentais e os grupos de controlo. As lacunas são registadas separadamente. A frequência das lacunas é incluída no relatório, mas, em geral, não é tida em conta na análise da frequência total das aberrações cromossómicas estruturais. Devem registar-se as percentagens de poliploidia e de células com cromossomas endorreduplicadas, sempre que ocorram.
36. Devem comunicar-se os dados relativos à toxicidade e aos sinais clínicos, em conformidade com o ponto 30.

Critérios de aceitabilidade

37. A aceitabilidade de um ensaio é determinada pelos seguintes critérios:
- O controlo negativo em paralelo está em sintonia com as normas publicadas relativas a dados históricos de controlo negativo – segundo as quais a percentagem prevista de células com aberrações cromossómicas deverá ser, em geral, $> 0\%$ e $\leq 1,5\%$ –, bem como com dados históricos de controlo do laboratório, se disponíveis (ver pontos 10 e 18).
 - Os controlos positivos realizados em paralelo induzem respostas coerentes com as normas publicadas relativas a dados históricos de controlo positivo ou com base de dados históricos de controlo positivo do laboratório, se disponíveis, e produzem um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo (ver pontos 17 e 18).
 - Analisaram-se números adequados de células e doses (ver pontos 28 e 32).
 - Os critérios de seleção da dose máxima são coerentes com os descritos nos pontos 25 e 26.
38. Se, para além das mitoses, também se observarem meioses, a relação entre o número de mitoses e de metáfases I ou II das espermatogónias deve ser determinada num total de 100 células em divisão por animal, para medição da citotoxicidade em todos os animais tratados e do controlo negativo. Se apenas se observarem mitoses, o índice mitótico deve ser calculado utilizando pelo menos 1 000 células de cada animal.

Avaliação e interpretação dos resultados

39. Devem analisar-se, pelo menos, três grupos tratados, de modo a proporcionar dados suficientes para uma análise da resposta à dosagem.

40. Caso sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

- pelo menos, uma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo;
- o aumento estiver relacionado com a dose em, pelo menos, um momento de amostragem;
- nenhum dos resultados estiver fora da gama aceitável de dados de controlo negativo ou da distribuição dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (por exemplo, limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), caso existam.

Nesse caso, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir aberrações cromossómicas em células espermatogónias dos animais de ensaio. As referências bibliográficas (11) e (18) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. Os testes estatísticos utilizados devem considerar o animal a unidade experimental.

41. Caso sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se:

- nenhuma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo;
- não se observar qualquer aumento relacionado com a dose em nenhuma condição experimental;
- todos os resultados estiverem dentro da gama aceitável de dados de controlo negativo ou dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (por exemplo, limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), caso existam.

Nesse caso, o produto químico em estudo não é considerado passível de induzir aberrações cromossómicas nas células espermatogónias dos animais sujeitos ao ensaio. As referências bibliográficas (11) e (18) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de o produto químico induzir aberrações cromossómicas em fases de desenvolvimento posteriores não estudadas, ou mutações genéticas.

42. As respostas inequivocamente positivas ou inequivocamente negativas não carecem de confirmação.

43. Se a resposta não for inequivocamente negativa ou positiva, e a fim de contribuir para o estabelecimento da adequação biológica de um resultado (por exemplo, um aumento ténue ou no limite), os dados devem ser avaliados por pareceres de peritos e/ou estudos complementares que utilizem os dados experimentais existentes, nomeadamente para determinar se o resultado positivo está fora da gama aceitável de dados de controlo negativo ou dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (19).

44. Em casos raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitem concluir se um resultado é positivo ou negativo, pelo que se considera inconclusivo.

45. Um aumento do número de células poliploides pode indicar que o produto químico em estudo apresenta potencial de inibição da mitose e de indução de aberrações cromossómicas numéricas (20). Um aumento do número de células com cromossomas endorreduplicados pode indicar que o produto químico em estudo apresenta potencial de inibição dos progressos do ciclo celular (21) (22), o que constitui um mecanismo de indução de mudanças cromossómicas numéricas diferente da inibição dos processos mitóticos (ver ponto 2). Por conseguinte, deve registar-se separadamente a incidência de células poliploides e de células com cromossomas endorreduplicados.

Relatório de ensaio

46. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Síntese.

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;
- estabilidade, se conhecida;
- solubilidade e estabilidade no solvente, se conhecidas;
- medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o caso.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- dados de identificação química, como: denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Preparação do produto químico em estudo:

- justificação da escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo.
- preparação de fórmulas alimentares, na água de beber ou inaláveis;
- determinações analíticas com essas fórmulas (p. ex., estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais). quando realizadas.

Animais utilizados no ensaio:

- espécie/estirpe utilizada e justificação da utilização;
- número e idade dos animais,
- proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;

- método de identificação unívoca dos animais

- para estudos de curta duração: peso individual dos animais machos no início e no final do teste; para estudos de duração superior a uma semana: pesos durante o estudo e consumo alimentar. Deve incluir-se, relativamente a cada grupo, a gama de pesos corporais, com a respetiva média e o desvio-padrão.

Condições de realização do ensaio:

- controlos positivos e negativos (veículo/solvente);

- resultados do eventual estudo exploratório da gama de dosagem;

- fundamentação da escolha das doses;

- justificação da via de administração escolhida;

- detalhes da preparação do produto químico em estudo;

- elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

- justificação do momento da eutanásia;

- métodos de medição da toxicidade para os animais, incluindo, sempre que disponíveis, análises histopatológicas ou hematológicas e a frequência com que foram realizadas observações dos animais e dos respetivos pesos corporais;

- métodos para verificar se o produto químico em estudo atingiu o tecido-alvo ou a circulação geral, caso se obtenham resultados negativos;

- dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos ou na água de beber (ppm) e do consumo, se aplicável;

- elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;

- descrição detalhada da exposição e do programa de colheita de amostras e justificação das escolhas feitas;

- método de eutanásia;

- eventual método de analgesia;

- procedimentos para o isolamento de tecidos;

- identidade do agente de fixação da metáfase e respetiva concentração e duração do tratamento;

- métodos de preparação das lâminas;

- critérios de contabilização das aberrações;
- número de células analisadas por animal;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo.

Resultados:

- estado dos animais antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;
- peso corporal e dos órgãos no momento da eutanásia (se forem utilizados múltiplos tratamentos, peso corporal durante o período de tratamento);
- sinais de toxicidade;
- índice mitótico;
- proporção de células espermatogónias em mitose em relação às células em metáfase meiótica I ou II ou outras provas da exposição ao tecido-alvo;
- tipo e número de aberrações, discriminados por animal;
- número total de aberrações em cada grupo, com as respetivas médias e desvios-padrão;
- número de células aberrantes em cada grupo, com as respetivas médias e desvios-padrão;
- relação dose-resposta, se possível;
- métodos estatísticos utilizados e análises estatísticas efetuadas;
- dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio;
- dados históricos de controlo negativo, com indicação de intervalos, médias, desvios-padrão e intervalos de confiança de 95 % (se disponíveis), ou dados históricos de controlo negativo publicados, utilizados para efeitos de aceitação dos resultados do ensaio;
- dados sobre o controlo positivo simultâneo;
- alterações da ploidia, quando observadas, incluindo as frequências de poliploidia e/ou de células endorredu-plicadas;

Discussão dos resultados

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312, 313-318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. *Mutation Res.*, 455, 167-189.
- (5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, *Mutation Res.*, 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (7) Cattanaach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, *Mutation Res.*, 12, 472-474.
- (8) Cattanaach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, *Mutation Res.*, 13, 371-375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, *Humangenetik* 29, 135-140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, *Mutation Res.*, 57(3): 313-324.
- (11) Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417, 19-30.
- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.

- (13) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291-294.
- (16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289-294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29-46.
- (21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.
- (22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.

Apêndice

DEFINIÇÕES

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na quebra, ou na quebra seguida de união, de cromatídeos simples.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na quebra, ou na quebra seguida de união, de ambos os cromatídeos no mesmo local.

Aberração estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detetável por exame microscópico das células em metáfase, na forma de supressão de segmentos, de alterações de partes da sequência ou da troca de segmentos num cromatídeo ou entre cromatídeos.

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico dos animais utilizados.

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

Centrómero: região ou regiões de um cromossoma às quais se ligam as fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento organizado dos cromossomas-filhos para os polos das células-filhas.

Clastogénio: produto químico que provoca aberrações cromossomáticas estruturais em populações de células ou organismos.

Diversidade cromossómica: diversidade de formas (por exemplo, metacêntrica, acrocêntrica, etc.) e tamanhos dos cromossomas.

Genotóxico: termo genérico que abrange todos os tipos de danos no ADN ou nos cromossomas, incluindo fraturas, supressão de segmentos, aduções, ligações e alterações nucleotídicas, rearranjos, mutações, aberrações cromossómicas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossómicos estáveis.

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

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromatídeo e que determina um ligeiro desalinhamento do mesmo.

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

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

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haploide (n), mas diferente do número diploide (ou seja, $3n$, $4n$ e assim por diante).

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

UVCB: substâncias químicas de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos.»

(5) Na parte B, o capítulo B.40 passa a ter a seguinte redação:

«B.40 CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO DA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA (RET)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 430 (2015) da OCDE. Entende-se por corrosão da pele a produção de danos irreversíveis nos tecidos cutâneos, que se manifestam como necrose visível em toda a epiderme e atingindo a derme, por aplicação de um produto químico em estudo [definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e pelo Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ⁽¹⁾]. O presente método de ensaio B.40 atualizado prevê um procedimento *in vitro* que permite a identificação de substâncias e misturas corrosivas e não corrosivas em conformidade com o sistema GHS da ONU (1) e com o CRE.
2. A determinação da corrosividade cutânea tem normalmente recorrido a animais de laboratório (método B.4, equivalente ao TG 404 da OCDE originalmente adotado em 1981 e revisto em 1992, 2002 e 2015) (2). Para além do presente método de ensaio B.40, foram validados e adotados outros métodos de ensaio *in vitro* para o ensaio do potencial de corrosão da pele dos produtos químicos, como o método de ensaio B.40bis (equivalente ao método TG 431 da OCDE) (3) e o método de ensaio B.65 (equivalente ao TG 435 da OCDE) (4), que também permitem identificar subcategorias de produtos químicos corrosivos, quando necessário. Foram adotados vários métodos de ensaio *in vitro* validados, como o método de ensaio B.46 [equivalente ao TG 439 da OCDE (5)], que devem ser utilizados para o ensaio de irritação cutânea. Um documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA) para a corrosão e irritação da pele descreve vários módulos que agrupam várias fontes de informação e instrumentos de análise e fornece orientações sobre (i) como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não provenientes de ensaios para a avaliação dos potenciais de irritação e de corrosão cutâneas dos produtos químicos e (ii) propõe uma abordagem quando há necessidade de ensaios complementares (6).
3. O presente método de ensaio incide na corrosão cutânea no ser humano. É baseado no método de ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET) da pele da ratazana, que utiliza discos de pele para identificar substâncias corrosivas pela sua capacidade de produzir uma perda da integridade normal do *status corneum* e da função de barreira. A diretriz de ensaio correspondente da OCDE foi adotada em 2004 e atualizada em 2015 para ter em conta o documento de orientação IATA.
4. A fim de avaliar testes de corrosão da pele *in vitro* para fins normativos, foram realizados estudos de pré-validação (7), seguidos de um estudo de validação formal do método de ensaio RET para avaliar a corrosão cutânea na pele de ratas (8) (9) (10) (11). O resultado destes estudos levou à recomendação de que o método de teste RET (designado método de referência validado – MRV) poderia ser utilizado para fins normativos para a avaliação da corrosividade de pele *in vivo* (12) (13) (14).
5. Antes de se poder utilizar um método de ensaio proposto de RET *in vitro* para a corrosão da pele diferente do MRV para efeitos normativos, é necessário determinar a sua fiabilidade e adequação (precisão), bem como as limitações para a utilização proposta, de modo a garantir a sua similaridade com o MRV, de acordo com os requisitos das normas de desempenho (15). A aceitação mútua de dados nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida no caso de métodos de ensaio novos ou atualizados de acordo com as normas de desempenho, se esses métodos tiverem sido revistos e incluídos na correspondente diretriz de ensaio da OCDE.

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas constam do apêndice.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Um estudo de validação (10) e outros estudos publicados (16) (17) indicaram que o método de ensaio de RET em pele de ratazana permite distinguir substâncias reconhecidamente corrosivas da pele e não corrosivas, com uma sensibilidade global de 94 % (51/54) e uma especificidade de 71 % (48/68) para uma base de dados de 122 substâncias.

⁽¹⁾ 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.

8. O presente método de ensaio incide na corrosão da pele *in vitro*. Permite a identificação de produtos químicos não corrosivos e corrosivos, em conformidade com o GHS da ONU/CRE. Uma limitação do método, comprovada pelos estudos de validação (8) (9) (10) (11), reside no facto de não permitir a subcategorização de substâncias e misturas corrosivas em conformidade com o GHS da ONU/CRE. O quadro regulamentar em causa determinará a forma como o método será aplicado. Embora não forneça informações adequadas sobre a irritação da pele, deve notar-se que o método B.46 incide especificamente no efeito de irritação cutânea da pele *in vitro* (5). Para uma avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica, consultar o documento de orientações da OCDE sobre IATA (6).

9. Uma vasta gama de produtos químicos, constituída essencialmente por substâncias, foi testada na validação subjacente ao presente método de ensaio; a base de dados empíricos do estudo de validação foi de 60 substâncias que cobrem um vasto leque de classes químicas (8) (9). Com base nos dados globais disponíveis, o método de ensaio é aplicável a um vasto leque de classes químicas e de estados físicos, incluindo líquidos, semissólidos, sólidos e ceras. No entanto, dado que, para determinados estados físicos específicos, não se encontram imediatamente disponíveis elementos de ensaio com dados de referência adequados, é de notar que, durante a validação, foi avaliado um número comparativamente pequeno de ceras e de sólidos corrosivos. Os líquidos podem ser aquosos ou não, e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis na água. Nos casos em que seja possível demonstrar a inaplicabilidade do método de ensaio a uma determinada categoria de substâncias, o mesmo não deve ser utilizado para essa categoria específica de substâncias. Presume-se, além disso, que o método é aplicável às misturas como extensão da sua aplicabilidade a substâncias. No entanto, uma vez que as misturas abrangem uma vasta gama de categorias e composições e que os dados atualmente disponíveis sobre a análise de misturas são limitados, o método não deve ser utilizado para uma categoria específica de misturas nos casos em que puder ser demonstrada a sua inaplicabilidade a essa categoria específica (por exemplo, na sequência de uma estratégia como a proposta por Eskes *et al.*, 2012) (18). Antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura. Os estudos de validação ainda não incidiram em gases e aerossóis (8) (9). Embora se admita que uns e outros possam ser testados com recurso ao método de ensaio de RET, a versão atual do método não permite o ensaio de gases nem de aerossóis.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

10. O produto químico em estudo é aplicado durante 24 horas, no máximo, sobre a superfície epidérmica de discos cutâneos num sistema de ensaio com dois compartimentos, no qual o disco estabelece a separação entre os compartimentos. Os discos cutâneos são retirados de ratazanas com 28 a 30 dias de idade, eutanasiadas. Os produtos químicos corrosivos são identificados pela sua capacidade de causarem uma perda da integridade normal do *stratum corneum* e da função de barreira, perda essa que é medida pela descida da RET abaixo de um determinado limiar (16) (ver ponto 32). Para determinação da RET na pele da ratazana, foi selecionado um valor-limite de 5 k Ω , com base numa multiplicidade de dados obtidos com uma vasta gama de substâncias, situando-se a grande maioria dos valores claramente muito acima (frequentemente > 10 k Ω) ou muito abaixo (frequentemente < 3 k Ω) desse valor (16). Em geral, os produtos químicos em estudo não são corrosivos para os animais, mas simplesmente irritantes (ou não irritantes), não reduzem a RET abaixo daquele valor-limite. A utilização de outras preparações cutâneas ou de outros equipamentos pode alterar o valor-limite, necessitando da correspondente validação.

11. O método inclui uma etapa de ligação de um corante, para a confirmação dos resultados positivos na determinação da RET (incluindo próximos de 5 k Ω). A etapa de ligação do corante esclarece se o aumento de permeabilidade iónica se deve à destruição física do *stratum corneum*. O método de determinação da RET em pele de ratazana revelou-se capaz de prever a corrosividade *in vivo* no coelho, determinada pelo TM B.4 (2).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

12. Antes de utilizarem de forma rotineira o método de ensaio de RET em pele de ratazana conforme ao presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, classificando corretamente as doze substâncias de referência recomendadas no quadro 1. No caso de uma substância incluída na lista estar indisponível ou sempre que se justifique, pode ser utilizada outra substância para a qual estejam disponíveis dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro* [por exemplo, da lista de produtos químicos de referência (16)], desde que sejam aplicados os critérios de seleção descritos no quadro 1.

Quadro 1
Lista de substâncias de referência ⁽¹⁾

Substância	N.º CAS	Classe química ⁽²⁾	SISTEMA GHS DA ONU/CRE Cat. com base em resultados <i>em vivo</i> ⁽³⁾	MRV Cat. com base em resultados <i>in vitro</i>	Estado físico	pH ⁽⁴⁾
Corrosivos <i>in vivo</i>						
N,N'-Dimetil dipropilenotriamina	10563-29-8	Base orgânica	1A	6 × C	L	8,3
1,2-Diaminopropano	78-90-0	Base orgânica	1A	6 × C	L	8,3
Ácido sulfúrico (10 %)	7664-93-9	Ácido inorgânico	(1A)/1B/1C	5 × C 1 × × NC	L	1,2
Hidróxido de potássio (solução aquosa a 10 %)	1310-58-3	Base orgânica	(1A)/1B/1C	6 × C	L	13,2
Ácido octanoico (caprílico)	124-07-2	Ácido orgânico	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2- <i>terc</i> -butilfenol	88-18-6	Fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Não corrosivos <i>in vivo</i>						
Ácido isoesteárico	2724-58-5	Ácido orgânico	NC	6 × NC	L	3,6
4-Amino-1,2,4-triazolo	584-13-4	Base orgânica	NC	6 × NC	S	5,5
Brometo de fenetilo	103-63-9	Eletrófilo	NC	6 × NC	L	3,6
4-(Metiltio)-benzaldeído	3446-89-7	Eletrófilo	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-Decadieno	1647-16-1	Orgânico neutro	NC	6 × NC	L	3,9
Tetracloroetileno	127-18-4	Orgânico neutro	NC	6 × NC	L	4,5

Abreviaturas: aq = aquoso; N.º CAS = número de registo do Chemical Abstracts Service; MRV = método de referência validado; C = corrosivo; NC = não corrosivo.

⁽¹⁾ As substâncias de referência, divididas, em primeiro lugar, em substâncias corrosivas e não corrosivas e depois em subcategorias de corrosão e em classes químicas, foram selecionadas a partir das substâncias utilizadas no estudo de validação ECVAM do método de ensaio de RET em pele de ratazana (8) (9). Salvo indicação em contrário, as substâncias foram ensaiadas ao nível de pureza obtido quando adquiridas no comércio (8). A seleção incluiu, na medida do possível, substâncias que: (i) sejam representativas da gama de respostas de corrosividade (p. ex. não corrosivas; fraca a forte corrosão) que o VRM é capaz de medir ou prever; (ii) sejam representativas das classes de produtos químicos utilizados no estudo de validação; (iii) reflitam as características de desempenho do VRM; (iv) tenham estruturas químicas bem definidas; (v) induzam resultados definitivos no método de ensaio de referência *in vivo*; (vi) estejam comercialmente disponíveis; e (vii) não estejam associadas a custos de eliminação proibitivos.

⁽²⁾ Classe química atribuída por Barratt *et al.* (8).

⁽³⁾ Os grupos de embalagem ONU correspondentes são, respetivamente, os I, II e III para as categorias 1A, 1B e 1C do GHS da ONU/CRE.

⁽⁴⁾ Os valores de pH foram obtidos a partir de Fentem *et al.* (9) e Barratt *et al.* (8).

PROCEDIMENTO

- Existem procedimentos operacionais normalizados (PON) para o método de ensaio de corrosão da pele de ratazana (19). Os protocolos de ensaio de RET em pele de ratazana abrangidos pelo presente método devem cumprir as condições que se seguem.

Animais

- Devem utilizar-se ratazanas, uma vez que a sensibilidade da sua pele às substâncias deste método de ensaio foi previamente demonstrada (12) e é a única fonte de pele que foi formalmente validada (8) (9). A estirpe e a idade da ratazana (no momento da colheita da pele) assumem particular importância, devendo os folículos pilosos encontrar-se na fase de dormência, antes do crescimento da pilosidade adulta.
- Com uma pequena tosquiadora, cortam-se cuidadosamente os pelos dorsais e dos flancos de ratazanas, fêmeas ou machos, jovens (estirpe Wistar ou comparável), com aproximadamente 22 dias de idade. Os animais são depois cuidadosamente lavados e esfregados, devendo a zona da pele que irá ser utilizada ser mergulhada numa solução antibiótica (contendo, por exemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol e anfotericina em concentrações suficientes para inibir o crescimento bacteriano). Os animais voltam a ser lavados com solução antibiótica no terceiro ou quarto dia após a primeira lavagem e são utilizados nos três dias seguintes à segunda lavagem, quando o *stratum corneum* tiver recuperado da tosquia.

Preparação dos discos cutâneos

- Os animais são eutanasiados entre a idade de 28 e 30 dias (este fator é muito importante). Em seguida, retira-se a pele dorsal lateral e remove-se a gordura subcutânea em excesso, raspando cuidadosamente. Cortam-se discos cutâneos de aproximadamente 20 mm de diâmetro. A pele pode ser guardada antes da utilização dos discos, desde que se demonstre que os dados de controlo (positivos e negativos) são equivalentes aos obtidos com pele fresca.
- Cada disco cutâneo é colocado numa das extremidades de um tubo de politetrafluoroetileno (PTFE), com a superfície epidérmica em contacto com o tubo. A pele é fixada na extremidade do tubo com uma junta tónica em borracha e elimina-se o tecido em excesso. A junta tónica é então envolvida em vaselina, de forma a garantir a estanquidade da sua união com o tubo de PTFE. Este é depois suspenso com uma tampa-suporte de molas dentro de uma câmara recetora com uma solução de $MgSO_4$ (154 mM) (figura 1). O disco cutâneo deve ficar totalmente imerso na solução de $MgSO_4$. Cada pele de ratazana pode fornecer de 10 a 15 discos cutâneos. As dimensões do tubo e da junta tónica são as apresentadas na figura 2.
- Antes do início do ensaio, a RET de dois discos cutâneos é medida a título de procedimento de controlo de qualidade para cada pele. Ambos os discos devem apresentar valores de resistência elétrica superiores a 10 k Ω para o resto dos discos a utilizar no método de ensaio. Se o valor da resistência for inferior a 10 k Ω , os discos restantes da pele em causa serão rejeitados.

Aplicação do produto químico em estudo e das substâncias de controlo

- Para garantir a adequabilidade do modelo experimental, devem utilizar-se em paralelo, em cada estudo (experiência), uma amostra de controlo positiva e uma amostra de controlo negativa. Em cada estudo (ensaio) devem utilizar-se discos de pele de um único animal. Como substâncias de controlo positivo e negativo sugerem-se o ácido clorídrico 10 M e a água destilada, respetivamente.
- Os produtos químicos em estudo líquidos são aplicados uniformemente (150 μ l) na superfície epidérmica no interior do tubo. Se a matéria ensaiada for sólida, aplicar-se-á uniformemente no disco uma quantidade suficiente da mesma, de modo a cobrir toda a superfície epidérmica. Em seguida, deita-se água desionizada (150 μ l) por cima do sólido e agita-se suavemente o tubo. Para garantir um contacto máximo com a pele, pode ser necessário aquecer as matérias sólidas a 30 °C, para fundir ou amolecer o produto químico em estudo, ou moê-las, para produzir um pó ou granulado.

21. São utilizados três discos de pele para cada ensaio e cada produto químico de controlo em cada série de ensaios. Os produtos químicos de ensaio são aplicados por 24 horas, a 20-23 °C. O produto químico é removido por lavagem com um jato de água da torneira até que seja atingida a temperatura ambiente e não haja mais material a remover.

Medições de RET

22. A impedância da pele é medida como RET por meio de uma ponte de Wheatstone de baixa tensão e corrente alternada (18). As especificações gerais da ponte de Wheatstone são as seguintes: tensão operacional de 1 V a 3 V, corrente alternada sinusoidal ou retangular de 50 Hz a 1 000 Hz e gama de medição de pelo menos 0,1 k Ω a -30 k Ω . A ponte utilizada no estudo de validação media valores de indutância, capacitância e resistência até 2 000 H, 2 000 μ F e 2 M Ω , respetivamente, a frequências de 100 Hz ou 1 kHz, utilizando valores em série ou em paralelo. Para o ensaio RET de corrosividade, as medições são registadas em resistência, à frequência de 100 Hz, utilizando valores em série. Antes da medição da resistência elétrica, reduz-se a tensão superficial da pele adicionando um volume de etanol a 70 % suficiente para cobrir toda a epiderme. Após alguns segundos, remove-se o etanol do tubo e hidrata-se o tecido adicionando 3 ml de solução de sulfato de magnésio (154 mM). Para medir a resistência do disco cutâneo em k Ω , colocam-se os elétrodos da ponte de Wheatstone de cada um dos lados do disco (figura 1). As dimensões dos elétrodos e o comprimento de cada eletrodo abaixo da pinça crocodilo são indicados na figura 2. A pinça aplicada ao eletrodo interno deve ficar apoiada no rebordo do tubo de PTFE durante a medição da resistência, de forma a garantir que o comprimento de eletrodo mergulhado na solução de sulfato de magnésio seja constante. O eletrodo externo deve ser colocado dentro da câmara recetora de forma a tocar no fundo da mesma. A distância entre a tampa-suporte de molas (*spring dip*) e o fundo do tubo de PTFE deve ser mantida constante (figura 2), porque afeta o valor de resistência medido. A distância entre o eletrodo interno e o disco cutâneo deve ser mínima (1 mm a 2 mm) e constante.
23. Se o valor de resistência medido exceder 20 k Ω , tal pode dever-se à presença de restos do produto químico em estudo na superfície epidérmica do disco cutâneo. Para eliminar essas matérias, poderá, por exemplo, tapar-se o tubo de PTFE com o polegar, usando luvas de borracha, e agitar-se durante cerca de 10 segundos. Rejeita-se a solução de sulfato de magnésio e repete-se a medição da resistência com solução fresca de MgSO₄.
24. As propriedades e dimensões da montagem de ensaio e o procedimento experimental aplicado podem influenciar os valores de RET obtidos. O limite de corrosão de 5 k Ω foi estabelecido a partir de dados obtidos com a montagem e segundo os procedimentos especificamente descritos no presente método. Se as condições de ensaio forem alteradas ou for utilizada uma montagem diferente, poderão ser aplicáveis outros valores-limite e de controlo. É, portanto, necessário calibrar a metodologia e os valores-limite de resistência ensaiando uma série de substâncias de referência selecionadas a partir das substâncias utilizadas no estudo de validação (8) (9), ou de classes químicas similares às das substâncias em estudo. O quadro 1 apresenta uma série de substâncias de referência adequadas.

Métodos da ligação de corante

25. A exposição a determinadas matérias não corrosivas pode originar uma redução da resistência para valores inferiores ao limite de 5 k Ω , ao permitir a passagem de iões através do *stratum corneum*, que se traduz numa redução da resistência elétrica (9). Determinados compostos orgânicos neutros e substâncias, por exemplo, tensoativas (detergentes, emulsionantes e outras substâncias), podem remover os lípidos cutâneos, daí resultando uma maior permeabilidade iónica da barreira. Assim, se os valores de RET produzidos por esses produtos químicos forem inferiores ou iguais a cerca de 5 k Ω , na ausência de lesões visualmente perceptíveis dos discos cutâneos, deve proceder-se a uma avaliação da penetração de corantes nos tecidos de controlo e nos tecidos tratados, a fim de determinar se os valores de RET obtidos se deveram a uma maior permeabilidade cutânea ou à corrosão da pele (7) (9). Neste último caso, se o *stratum corneum* estiver danificado, o corante sulforrodamina B, uma vez aplicado na superfície da pele, penetrará rapidamente e colorará o tecido subjacente. Este corante específico é estável perante uma grande variedade de substâncias, e não é afetado pelo processo de extração acima referido.

Aplicação e eliminação do corante sulforrodamina B

26. Depois da determinação da RET, a solução de sulfato de magnésio é removida do tubo e verifica-se cuidadosamente se a pele apresenta danos evidentes. Se não houver danos graves óbvios (por exemplo, perfuração), são aplicados à superfície epidérmica de cada disco de pele, durante 2 horas, 150 μ l de uma solução a 10 % (m/v) em água destilada do corante sulforrodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; número CAS 3520-42-1). Lavam-se de seguida os discos em água corrente, à temperatura ambiente, durante cerca de 10 segundos, a fim de remover o corante em excesso ou não fixado. Os discos de pele devem então ser cuidadosamente retirados do tubo de PTFE e colocados num recipiente (por exemplo: um frasco de 20 ml) com água desmineralizada (8 ml). Agitam-se

cuidadosamente os frascos durante 5 minutos, para remover os restos de corante que eventualmente não se tenham fixado. Repete-se este procedimento de lavagem e transferem-se os discos cutâneos para frascos que contenham 5 ml de uma solução a 30 % (m/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS) em água destilada, incubando-se a 60 °C de um dia para o outro.

27. Depois da incubação, os discos cutâneos são retirados e rejeitados e a solução remanescente em cada frasco é centrifugada durante 8 minutos a 21 °C (força relativa de centrifugação: $\sim 175 \times g$). Dilui-se então a 1:5 (v/v, ou seja, 1 ml + 4 ml) uma amostra de 1 ml do líquido sobrenadante com uma solução a 30 % (m/v) de SDS em água destilada. Mede-se a densidade ótica da solução resultante, a 565 nm.

Cálculo da concentração de corante

28. A concentração do corante sulforrodamina B por disco é calculada a partir dos valores de densidade ótica (9) (coeficiente de extinção molar do corante sulforrodamina B a 565 nm = $8,7 \times 10^4$; massa molecular = 580). Utilizando uma curva de calibração apropriada, determina-se a concentração de corante correspondente a cada disco cutâneo, calculando-se em seguida uma concentração média de corante para os replicados.

Crítérios de aceitabilidade

29. Os valores médios de RET obtidos serão aceites se os valores das amostras de controlo positiva e negativa correspondentes se encontrarem dentro dos intervalos aceitáveis para o método no laboratório de ensaio. Os intervalos de resistência aceitáveis para o método e a montagem acima descritos são indicados no quadro seguinte:

Controlo	Substância	Intervalo de resistência (k Ω)
Positivo	Ácido clorídrico 10 M	0,5 – 1,0
Negativo	Água destilada	10 – 25

30. Os valores médios obtidos para a ligação do corante serão aceites se os valores das amostras de controlo correspondentes se encontrarem dentro dos intervalos aceitáveis para o método. Os intervalos aceitáveis de concentração de corante que se sugerem para as substâncias de controlo, para o método e a montagem acima descritos, são indicados no quadro seguinte:

Controlo	Substância	Intervalo de concentração de corante ($\mu\text{g}/\text{disco}$)
Positivo	Ácido clorídrico 10 M	40 – 100
Negativo	Água destilada	15 – 35

Interpretação dos resultados

31. O valor-limite de TER que permite distinguir os produtos químicos corrosivos dos não corrosivos foi estabelecido durante a fase de otimização do método, testado numa fase de pré-validação e confirmado num estudo de validação formal.
32. O modelo de previsão do método de ensaio de corrosão cutânea em ratazanas (9) (19), associado ao sistema de classificação GHS da ONU/CRE, é apresentado a seguir:

O produto químico em estudo é considerado não corrosivo para a pele se:

- i) o valor médio de RET obtido para a substância em estudo exceder 5 k Ω , ou
- ii) o valor médio de RET obtido para o produto químico em estudo for inferior ou igual a 5 k Ω e
 - os discos de pele não apresentarem danos evidentes (por exemplo, perfuração) e
 - o teor médio de corante dos discos for inferior ao teor médio de corante de 10M de HCl para o controlo positivo obtido simultaneamente (ver ponto 30 para valores de controlo positivo).

Considera-se que o produto químico em estudo é corrosivo para a pele se:

- i) o valor médio de RET obtido para o produto químico em estudo for inferior ou igual a 5 k Ω e os discos de pele estiverem claramente danificados (por exemplo, perfurados), ou
 - ii) o valor médio de RET obtido para o produto químico em estudo for inferior ou igual a 5 k Ω e
 - os discos de pele não apresentarem danos evidentes (por exemplo, perfuração), mas
 - a concentração média de corante do disco for superior ou igual à concentração média de corante de 10M de HCl para o controlo positivo obtido simultaneamente (ver ponto 30 para valores de controlo positivo).
33. Se a classificação do produto químico em estudo for inequívoca, basta normalmente uma série de ensaios (experiência) constituída por, pelo menos, três discos replicados de pele. Contudo, em caso de resultados inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados e/ou RET médio igual a $5 \pm 0,5$ k Ω , deve ser considerada uma segunda série de testes independentes (experiência), bem como uma terceira em caso de resultados discordantes entre os dois primeiros ensaios (experiências).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os valores da resistência (k Ω) e os valores do teor de corante (μ g/disco), se for caso disso, para o produto químico em estudo, bem como para os controlos positivos e negativos devem ser apresentados sob a forma de uma tabela, incluindo os dados para cada disco individual replicado (experiência) e os valores médios \pm do DP. Todas as repetições de experiências devem ser comunicadas. Devem comunicar-se os danos observados nos discos cutâneos relativamente a cada produto químico em estudo.

Relatório de ensaio

35. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo e substâncias de controlo

- Substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;

- Substância multicomponentes, UVCB e mistura: caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas dos componentes;
- Aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- Proveniência e número do lote, se disponíveis;
- Tratamento do produto químico em estudo/substância de controlo antes do ensaio, se for o caso;
- Estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas;
- Condições de armazenagem.

Animais de ensaio

- Estipe e sexo;
- Idade dos animais no momento em que foram dados;
- Proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;
- Pormenores sobre a preparação da pele.

Condições de realização do ensaio

- Curvas de calibração da montagem de ensaio;
- Curvas de calibração para o ensaio de desempenho de ligação do corante, filtro de banda passante utilizado para a medição da densidade ótica (DO) e linearidade do dispositivo de medição da DO (espectrofotómetro), se for caso disso;
- Pormenores sobre o método de ensaio utilizado na medição das RET;
- Pormenores sobre o método de ensaio utilizado na medição da ligação do corante, se tiver sido o caso;
- Doses de ensaio utilizadas, duração do(s) período(s) de exposição e temperatura(s) de exposição;
- Informações pormenorizadas sobre o procedimento de lavagem utilizado após o período de exposição;
- Número de replicados cutâneos utilizados para cada produto químico em estudo (controlos positivos e negativos);
- Descrição de eventuais modificações na execução do ensaio;

— Referência a dados anteriormente publicados sobre o modelo; tal deve incluir, nomeadamente, o seguinte:

- i) Aceitabilidade dos valores do controlo positivo e negativo de RET (em $k\Omega$), por referência aos intervalos de resistência do controlo positivo e negativo,
- ii) Aceitabilidade dos valores do controlo positivo e negativo do teor de corante (em $\mu\text{g}/\text{disco}$) por referência a concentrações de corante de controlo positivo e negativo,
- iii) Aceitabilidade dos resultados do ensaio por referência à variabilidade histórica entre os replicados do disco cutâneo,

— Descrição do modelo de critérios de decisão/previsão aplicado.

Resultados

— Quadro dos dados correspondentes aos ensaios específicos de determinação da RET e de ligação dos corantes (se for caso disso) para cada produto químico em estudo e controlos, para cada série de ensaios (experiências) e cada replicado de disco cutâneo (animais individuais e amostras individuais de pele), médias, DS e CV;

— Descrição dos efeitos eventualmente observados;

— Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Nações Unidas (ONU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponível em: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- (2) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»
- (3) Capítulo B.40-A deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*:»
- (4) Capítulo B.65 deste anexo: «Método de ensaio da membrana de estanquidade *in vitro*»
- (5) Capítulo B.46 deste anexo, «Irritação cutânea *in vitro*: método de ensaio em epiderme humana reconstruída»
- (6) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483- 524.
- (10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.
- (11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* 26, 275-280.
- (14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (15) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
- (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6, 191-194.
- (18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

- (19) TER SOP (December 2008). INVITTOX Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
- (20) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Figura 1

Montagem Para o Ensaio da ret em Pele de Ratazana

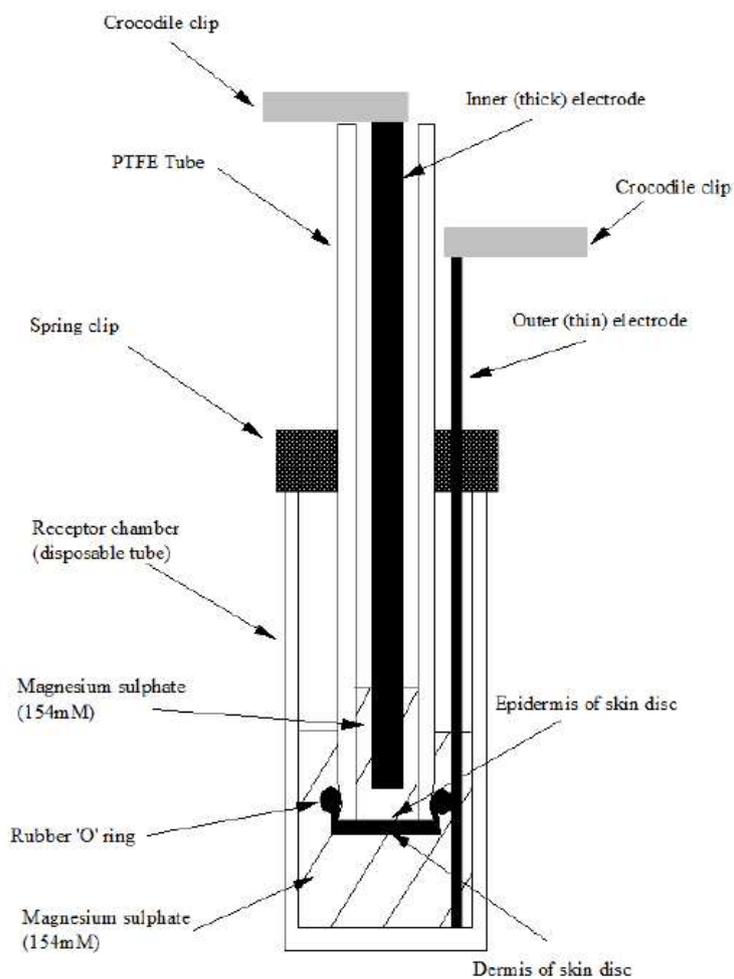
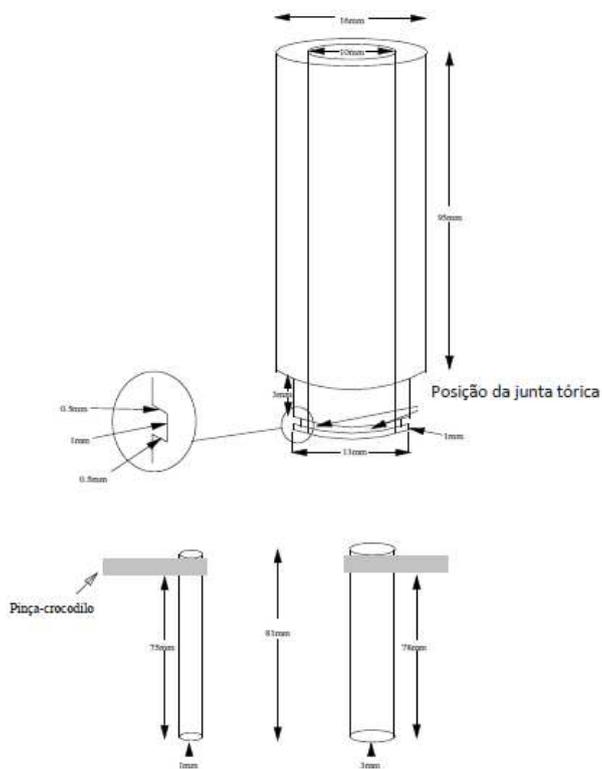


Figura 2

Dimensões do tubo de Politetrafluoroetileno (PTFE) e do Tubo Recetor, bem como dos Eléctrodos Utilizados



Fatores críticos da montagem ilustrada:

- Diâmetro interno do tubo de PTFE;
- Comprimento dos eléctrodos em relação ao tubo de PTFE e ao tubo recetor, para que os eléctrodos não toquem no disco cutâneo e de modo que um comprimento fixo de eléctrodo esteja em contacto com a solução de $MgSO_4$;
- A quantidade de solução de $MgSO_4$ no tubo recetor deve produzir, em relação ao nível no tubo de PTFE, um nível de líquido conforme o ilustrado na figura 1;
- O disco cutâneo deve ser convenientemente fixado ao tubo de PTFE, para que a resistência eléctrica seja uma medida fiável das propriedades da pele.

Apêndice

DEFINIÇÕES

Adequação: Relação do método de ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o método de ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (20).

C: Corrosivo

Concordância: Uma medida do 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 muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de produtos químicos testados que são corretamente classificados como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência do produto químico em estudo positivos no tipo de produto químico em estudo (20).

Corrosão da pele *in vivo*: Produção de danos irreversíveis à pele, nomeadamente a necrose visível da epiderme, prolongando-se para a derme, após a aplicação de um produto químico em estudo durante um máximo de quatro horas. São exemplos típicos de reações corrosivas as úlceras, hemorragias e escaras sanguinolentas e, para o final do período de observação de 14 dias, a descoloração, devido à perda de pigmentação da pele, a formação de zonas de alopecia total e a ocorrência de cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser esclarecidas por métodos histopatológicos.

CP: Amostra de controlo positiva, um replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com uma substância que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

DO: Densidade ótica.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de 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 (20).

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 (20).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (20).

GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (ONU)): Sistema 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 correspondentes elementos de comunicação, 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).

IATA: Abordagem integrada de ensaio e avaliação.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

NC: Não corrosivo.

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. Incluem: (i) componentes essenciais do método de ensaio; (ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (iii) níveis de fiabilidade e exatidão semelhantes, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

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

Resistência elétrica transcutânea (RET): Valor da resistência em k Ω medido para a impedância elétrica da pele. Trata-se de um método simples e robusto de avaliação da função de barreira por meio do registo do fluxo iónico através da pele com uma ponte de Wheatstone.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de 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 (20).

Série (de ensaio): Um único produto químico em estudo testado simultaneamente num mínimo de três discos de pele.

Substância: um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.»

(6) Na parte B, o capítulo B.40.A passa a ter a seguinte redação:

«B.40.A. **CORROSÃO DA PELE IN VITRO: MÉTODO DE ENSAIO COM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA (RHE)**

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 431 (2016) da OCDE. Entende-se por corrosão da pele a produção de danos irreversíveis nos tecidos cutâneos, que se manifestam como necrose visível em toda a epiderme e atingindo a derme, por aplicação de um produto químico em estudo [definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e pelo Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) (1)]. O presente método de ensaio B.40bis atualizado prevê um procedimento *in vitro* que permite a identificação de substâncias e misturas corrosivas e não corrosivas em conformidade com o sistema GHS da ONU e com o CRE. Permite igualmente uma subcategorização parcial de substâncias corrosivas.
2. A determinação do potencial de corrosão cutânea de produtos químicos tem normalmente recorrido a animais de laboratório (método B.4 ao TG 404 da OCDE originalmente adotado em 1981 e revisto em 1992, 2002 e 2015) (2). Para além do presente método de ensaio B.40bis, foram validados e adotados dois outros métodos para o ensaio *in vitro* do potencial de corrosão da pele dos produtos químicos, como o método B.40 (equivalente ao método TG 430 da OCDE) (3) e o método B.65 (equivalente ao método TG 435 da OCDE) (4). Além disso, foi adotado o método B.46 (equivalente à *Test Guideline* TG 439 da OCDE) (5) para o ensaio *in vitro* do potencial de irritação cutânea. Um documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA) para a corrosão e corrosão da pele descreve vários módulos que agrupam as fontes de informação e os instrumentos de análise e fornece orientações sobre: i) como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não obtidos no ensaio de avaliação de potenciais de produtos químicos em termos de irritação cutânea e de corrosão cutânea e ii) propor uma abordagem na necessidade de ensaios complementares (6).
3. O presente método de ensaio incide na corrosão cutânea no ser humano. Utiliza a epiderme humana reconstruída (obtida a partir de queratinócitos de epiderme humana não transformados) que reproduz com rigor as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das partes superiores da pele humana, isto é, da epiderme. A diretriz de ensaio da OCDE foi adotada inicialmente em 2004 e atualizada em 2013, a fim de incluir métodos de ensaio adicionais utilizando modelos de epiderme humana reconstruída e a possibilidade de utilizar os métodos de apoio à subcategorização de produtos químicos corrosivos e de novo atualizada em 2015 para ter em conta o documento de orientação da IATA e para introduzir a utilização de um procedimento alternativo para a medição da viabilidade.
4. O presente método inclui quatro modelos validados comercialmente disponíveis de epiderme humana reconstruída. Foram realizados estudos de pré-validação (7), seguidos de um estudo de validação formal para avaliar a corrosão da pele (8) (9) (10) (12) relativamente a dois desses modelos de ensaio comercialmente disponíveis, o método Modelo Normalizado de EpiSkin™ e o método Ensaio de corrosividade cutânea EpiDerm™ (EPI-200), referidos no texto como métodos de referência validados – MRV. O resultado destes estudos levou à recomendação de que os dois MRV supramencionados podem ser utilizados para fins normativos para distinguir as substâncias corrosivas (C) das substâncias não corrosivas (NC) e de que o método EpiSkin™ pode, além disso, ser utilizado para apoiar a subcategorização das substâncias corrosivas (13) (14) (15). Dois outros modelos de ensaio de corrosão cutânea *in vitro* em epiderme humana reconstruída disponíveis comercialmente em corrosão cutânea *in vitro* têm mostrado resultados similares ao do MRVEpiDerm™ de acordo com a validação baseada em PS (16)(17)(18). Trata-se de SkinEthic™ RHE (2) and epiCS® (anteriormente designado EST-1000), que também podem ser utilizados para fins normativos, para distinguir substâncias corrosivas e não corrosivas (19) (20). Estudos de pós-validação realizados pelos produtores do modelo de epiderme humana reconstruída nos anos de 2012 a 2014 com um protocolo aperfeiçoado que corrige interferências de redução MTT inespecífica pelo produto químico em estudo permitiram melhorar o desempenho da discriminação de C/NC, bem como da subcategorização de corrosivos (21) (22). Foram realizadas outras análises estatísticas dos dados pós-validação gerados com EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE and epiCS® para identificar modelos previsionais alternativos que tenham melhorado a capacidade de prever a subcategorização (23).

(1) 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.

(2) A abreviatura RHE (epiderme humana reconstruída) é utilizada para todos os modelos baseados na tecnologia de RHE. A abreviatura RHE utilizada em conjunção com o modelo SkinEthic™ significa o mesmo, mas, como parte do nome do método de teste específicos comercializado, é escrito em maiúsculas.

5. Antes de se poder utilizar um método de ensaio proposto de RhE *in vitro* para a corrosão da pele similar ou alterado diferente dos MRV para efeitos normativos, é necessário determinar a sua fiabilidade e adequação (exatidão), bem como as limitações para a utilização proposta, de modo a garantir a sua similaridade com os MRV, de acordo com os requisitos das normas de desempenho (15) estabelecidas em conformidade com os princípios do documento de orientação n.º 34 da OCDE (25). A aceitação mútua de dados nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida no caso de métodos de ensaio novos ou atualizados de acordo com as normas de desempenho, se estes métodos tiverem sido revistos e incluídos na correspondente diretriz de ensaio da OCDE. Os modelos de ensaio incluídos nessa diretriz de ensaio podem ser utilizados para satisfazer as exigências dos países em matéria de resultados dos ensaios sobre o método de ensaio *in vitro* da corrosão cutânea, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados.

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. O presente método de ensaio permite a identificação de substâncias e misturas corrosivas e não corrosivas em conformidade com o GHS da ONU e com o CRE. Corroborar a subcategorização de substâncias e misturas corrosivas na subcategoria facultativa 1A, em conformidade com o sistema GHS da ONU (1), bem como numa combinação das subcategorias 1B e 1C (21) (22) (23). Uma limitação deste método é que não permite discriminar entre a subcategoria 1B e a subcategoria 1C, de acordo com o GHS da ONU e com o CRE, devido ao conjunto limitado de produtos químicos corrosivos *in vivo* conhecidos da subcategoria 1C. Os modelos de ensaio EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE and epiCS® permitem classificar em subcategorias (ou seja, 1A *versus* 1B e 1C *versus* NC)
8. Uma vasta gama de produtos químicos – principalmente substâncias individuais – foi testada, na validação, para apoio dos modelos de ensaio incluídos neste método, utilizados para a identificação de substâncias corrosivas e não corrosivas; a base de dados empíricos do estudo de validação foi constituída por 60 produtos químicos que cobrem um vasto leque de classes químicas (8) (9) (10). Os ensaios para demonstrar a sensibilidade, a especificidade, a exatidão e a reprodutibilidade intralaboratorial do ensaio para a subcategorização foram realizados pelos concetores do método; os resultados foram revistos pela OCDE (21) (22) (23). Com base nos dados globais disponíveis, o método de ensaio é aplicável a um vasto leque de classes químicas e de estados físicos, incluindo líquidos, semissólidos, sólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não, e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis na água. Sempre que possível, os sólidos devem ser moídos em pó fino antes da aplicação; nenhum outro tratamento prévio da amostra é necessário. Nos casos em que se possa demonstrar a inaplicabilidade de modelos de ensaio incluídos neste método a uma categoria específica de produtos químicos em estudo, estes não devem ser utilizados para essa categoria específica de produtos químicos. Presume-se, além disso, que o método de ensaio é aplicável às misturas como extensão da sua aplicabilidade a substâncias. No entanto, uma vez que as misturas abrangem uma vasta gama de categorias e composições e que só se dispõe atualmente de informações limitadas sobre a análise de misturas, nos casos em que se possa demonstrar a inaplicabilidade do método de ensaio a uma categoria específica de misturas – por exemplo, na sequência de uma estratégia como a proposta no ponto (26) –, o método de ensaio não deve ser utilizado para essa categoria específica de misturas. Antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o mesmo pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura. Os gases e aerossóis ainda não foram avaliados em estudos de validação (8) (9) (10). Embora se possa considerar que podem ser ensaiados utilizando a tecnologia da epiderme humana reconstruída, o método de ensaio atual não permite o ensaio de gases e aerossóis.
9. Os produtos químicos que absorvem luz na mesma gama que o MTT formazano e os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o corante vital MTT (MTT formazano) podem interferir nas medições da viabilidade dos tecidos e requerer a aplicação de controlos adaptados para correções. O tipo de controlos adaptados que podem ser necessários varia em função do tipo de interferência resultante do produto químico em estudo e do procedimento utilizado para medir o formazano MTT (ver pontos 25 a 31).

10. Embora o presente método de ensaio não forneça informações adequadas sobre a irritação da pele, deve notar-se que o método B.46 aborda especificamente a irritação cutânea *in vitro* e se baseia no mesmo sistema de ensaio de RhE, embora com outro protocolo (5). Para uma avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica, deve consultar-se o documento de orientações da OCDE relativo a abordagens integradas de ensaio e avaliação da OCDE (6). Esta abordagem IATA inclui a realização de ensaios de corrosão cutânea *in vitro* (tal como descrito no presente método) e de irritação cutânea, antes de ponderar a realização de ensaios em animais vivos. Sabe-se que a utilização de pele humana está sujeita a condições e argumentos nacionais e internacionais de natureza ética.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. 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 com várias camadas e altamente diferenciado. Este 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*.
12. O método de ensaio RhE baseia-se na premissa de que os produtos químicos corrosivos podem penetrar no *stratum corneum* por difusão ou erosão e são citotóxicos para as células das camadas subjacentes. A viabilidade celular é medida por conversão enzimática do corante vital MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-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 (20). Os produtos químicos corrosivos são identificados pela sua capacidade de reduzir a viabilidade celular abaixo dos limiares definidos (ver pontos 35 e 36). O método de ensaio de corrosão cutânea baseado na epiderme humana reconstruída revelou-se capaz de prever efeitos de corrosão da pele *in vivo* avaliados em coelhos, de acordo com o método de ensaio B.4 (2).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

13. Antes de utilizarem de forma rotineira qualquer um dos quatro modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída validados conformes com o presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, classificando corretamente as doze substâncias de referência enumeradas no quadro 1. Caso seja utilizado um método para subclassificação, deve também demonstrar-se a correta subcategorização. Caso uma substância constante da lista esteja indisponível ou sempre que se justifique, pode utilizar-se outra substância para a qual existam dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro* – por exemplo, da lista de produtos químicos de referência (24) –, desde que sejam aplicados os critérios de seleção descritos no quadro 1.

Quadro 1

Lista de substâncias de referência ⁽¹⁾

Substância	N.º CAS	Classe química ⁽²⁾	Categoria GHS da ONU/CRE Com base em resultados <i>in vivo</i> ⁽³⁾	MRV Cat. Com base em resultados <i>in vitro</i> ⁽⁴⁾	MTT redutor ⁽⁵⁾	Estado físico
Subcategoria 1A Corrosivos <i>in vivo</i>						
Ácido bromoacético	79-08-3	Ácido orgânico	1A	(3) 1A	—	S
Trifluoreto de boro di-hidratado	13319-75-0	Ácido inorgânico	1A	(3) 1A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	S
Cloreto de dicloroacetilo	79-36-7	Eletrófilo	1A	(3) 1A	—	L
Combinação das subcategorias 1B e 1C de corrosivos <i>in vivo</i>						
Ácido glicóxico mono-hidratado	563-96-2	Ácido orgânico	1B e 1C	(3) 1B e 1C	—	S

Substância	N.º CAS	Classe química ⁽²⁾	Categoria GHS da ONU/CRE Com base em resultados <i>in vivo</i> ⁽³⁾	MRV Cat. Com base em resultados <i>in vitro</i> ⁽⁴⁾	MTT redutor ⁽⁵⁾	Estado físico
Subcategoria 1A Corrosivos <i>in vivo</i>						
Ácido láctico	598-82-3	Ácido orgânico	1B e 1C	(3) 1B e 1C	—	L
Etanolamina	141-43-5	Base orgânica	1B	(3) 1B e 1C	Sim	Viscoso
Ácido clorídrico (14,4 %)	7647-01-0	Ácido inorgânico	1B e 1C	(3) 1B e 1C	—	L
Não corrosivos <i>in vivo</i>						
Brometo de fenetilo	103-63-9	Eletrófilo	NC	(3) NC	Sim	L
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Base orgânica	NC	(3) NC	—	S
4-(Metiltio)-benzaldeído	3446-89-7	Eletrófilo	NC	(3) NC	Sim	L
Ácido láurico	143-07-7	Ácido orgânico	NC	(3) NC	—	S

Abreviaturas: N.º CAS = número de registo do Chemical Abstracts Service; MRV = método de referência validado; NC = Não Corrosivo; S = sólido; L = líquido

(1) As substâncias de referência, divididas, em primeiro lugar, em substâncias corrosivas e não corrosivas e, depois, em subcategorias de corrosão e em classes químicas, foram selecionadas a partir das substâncias utilizadas nos estudos de validação ECVAM do EpiSkin™ e do EpiDerm™ (8) (9) (10), como em estudos pós-validação baseados em dados fornecidos pelos criadores do EpiSkin™ (22), do EpiDerm™, do SkinEthic™ e do epiCS® (23). Salvo indicação em contrário, as substâncias foram ensaiadas com o grau pureza da sua forma comercial (8) (10). A seleção inclui, na medida do possível, substâncias: (i) representativas da gama de respostas de corrosividade (p. ex., não corrosivas; fraca a forte corrosão) que o MRV é capaz de medir ou prever; (ii) representativas das classes de produtos químicos utilizados nos estudos de validação; (iii) com estruturas químicas bem definidas; (iv) que induzam resultados reprodutíveis no MRV; (v) que induzam resultados definitivos no método de ensaio de referência *in vivo*; (vi) disponíveis nos circuitos comerciais; e (vii) sem custos de eliminação proibitivos.

(2) Classe química atribuída por Barratt *et al.* (8).

(3) Os grupos de embalagem ONU correspondentes são, respetivamente, o I, II e III para as categorias 1A, 1B e 1C do GHS da ONU/CRE.

(4) As previsões *in vitro* de MRV validados contantes deste quadro foram obtidas com os modelos de ensaio EpiSkin™ e EpiDerm™ (MRV) nos ensaios de pós-validação realizados pelos concetores do método de ensaio.

(5) Os valores de viabilidade obtidos nos estudos de validação de corrosão cutânea do ECVAM não foram corrigidos para redução direta do MTT (não foram realizados controlos aos animais mortos nos estudos de validação). No entanto, os dados pós-validação gerados pelos concetores dos métodos de ensaio que se apresentam neste quadro foram obtidos com base em controlos adaptados (23).

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 produtor 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 um método de ensaio 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 de ensaio, se continue a avaliar periodicamente as propriedades de barreira.

PROCEDIMENTO

15. Apresenta-se em seguida uma descrição genérica dos componentes e procedimentos dos modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída para avaliação da corrosão cutânea abrangidos pelo presente método de ensaio. Os modelos de epiderme humana reconstruída aprovados como cientificamente válidos para utilização neste método de ensaio, ou seja, os modelos EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic RHE™ e epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), podem ser obtidos nos circuitos comerciais. Os procedimentos operacionais normalizados (PON) para estes quatro modelos de epiderme humana reconstruída estão disponíveis (34) (35) (36) (37); os principais componentes de método de ensaio são resumidos no apêndice 2. Recomenda-se que o respetivo PON seja consultado aquando da implementação e utilização de um desses modelos no laboratório. Os ensaios com os quatro modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída abrangidos por este método devem respeitar 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 último 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, SDS ou o Triton X-100. Deve demonstrar-se a função de barreira, que pode ser avaliada determinando a concentração à qual o produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (IC₅₀) após um tempo de exposição fixo, ou determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 % (EF₅₀), mediante a aplicação do produto químico de referência a uma concentração especificada e fixa (ver ponto 18). 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. O ensaio MTS (27) é utilizado para quantificar a viabilidade dos tecidos. As células viáveis do tecido de epiderme humana reconstruída reduzem o corante vital MTT a um precipitado azul de formazano que é depois extraído do tecido com isopropanol ou um solvente semelhante. A densidade ótica do solvente de extração deve ser suficientemente reduzida (DO < 0,1). O formazano extraído pode ser quantificado utilizando um método de medição da absorvância normalizado ou espectrofotometria HPLC/UPLC (38). Os utilizadores do modelo de epiderme humana reconstruída devem garantir que cada lote de epiderme humana reconstruída utilizado preenche os critérios de controlo negativo. O concetor/fornecedor de epiderme humana reconstruída deve estabelecer um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para os valores de controlo negativo da densidade ótica. Apresentam-se no quadro 2 os intervalos de aceitabilidade dos valores de controlo negativo da densidade ótica para os quatro modelos de ensaio validados incluídos no presente método de ensaio. Um utilizador de espectrofotometria HPLC/UPLC deve utilizar as gamas de controlo negativo da densidade ótica indicadas no quadro 2 como critério de aceitação para o controlo negativo. Deve documentar-se a estabilidade em cultura dos tecidos tratados com controlo negativo durante o período de exposição (fornecer medições de densidade ótica pertinentes).

Quadro 2

Intervalos de aceitabilidade dos valores de controlo negativo da densidade ótica para controlo da qualidade dos lotes

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200).	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Função de barreira

18. O *stratum corneum* e a sua composição lipídica devem ser suficientes para resistir a uma penetração rápida de certos produtos químicos marcadores citotóxicos (por exemplo, SDS ou Triton X-100), estimada com base na IC₅₀ ou no ET₅₀ (quadro 3). A função de barreira de cada lote do modelo de epiderme humana reconstruída deve ser demonstrada pelo concetor/vendedor do modelo de epiderme humana reconstruída aquando da entrega dos tecidos ao utilizador final (ver ponto 21).

Morfologia

19. No contexto do exame histológico do modelo RhE, a estrutura multicamadas análoga da epiderme humana deve conter camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e *stratum corneum*, e exibir um perfil lipídico similar ao perfil lipídico da epiderme humana. O perfil histológico de cada lote do modelo de epiderme humana reconstruída deve ser fornecido pelo concetor/vendedor do modelo de epiderme humana reconstruída aquando da entrega dos tecidos ao utilizador final (ver ponto 21).

Reprodutibilidade

20. Os utilizadores do método de ensaio devem demonstrar a reprodutibilidade do mesmo ao longo do tempo, com os controlos positivos e negativos. Além disso, o método de teste deve ser usado somente se o criador/fornecedor modelo RhE fornecer dados que demonstrem a reprodutibilidade ao longo do tempo com produtos químicos corrosivos e não corrosivos, por exemplo, constantes da lista de substâncias de referência (quadro 1). Caso seja utilizado um método de ensaio para a subcategorização, deve igualmente demonstrar-se a reprodutibilidade no que respeita a esta última.

Controlo de qualidade

21. O modelo de epiderme humana reconstruída só deve ser utilizado se o concetor/fornecedor demonstrar que cada lote do modelo de epiderme humana reconstruída satisfaz determinados critérios de aptidão, dos quais os de viabilidade (ponto 17), função de barreira (ponto 18) e morfologia (ponto 19) são os mais importantes. Estes dados são fornecidos aos utilizadores do método para que estes possam incluir tais informações no relatório de ensaio. Só os resultados obtidos com lotes de tecidos QC aceites podem ser utilizados para a previsão fiável da classificação corrosiva. O criador/fornecedor de epiderme humana reconstruída estabelece um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para IC₅₀ ou TE₅₀. Indicam-se no quadro 3 os intervalos de aceitabilidade para os quatro modelos de ensaio validados.

Quadro 3

Crítérios de controlo da qualidade para liberação dos lotes

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamento com (SDS) (33)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200). (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 horas	ET ₅₀ = 8,7 horas
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 horas	ET ₅₀ = 10,0 horas
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 horas	ET ₅₀ = 7,0 horas

Aplicação dos produtos químicos em estudo e de controlo

22. Devem usar-se, pelo menos, dois tecidos replicados para cada produto químico em estudo, bem como controlos para cada período de exposição. Tanto no caso dos líquidos como dos sólidos, 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 70 µl/cm² ou 30 mg/cm². Consoante os modelos, a superfície da epiderme deve ser humedificada com água desionizada ou destilada antes da aplicação de produtos químicos sólidos, para melhorar o contacto entre o produto químico em estudo e a superfície da epiderme (34) (35) (36) (37). Sempre que possível, os sólidos devem ser aplicados na forma de pó fino. O método de aplicação deve ser adequado ao

produto químico em estudo – ver, por exemplo, as referências (34-37). Após o período de exposição, o produto 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. Dependendo de qual dos quatro modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída validados for utilizado, aplicam-se dois ou três períodos de exposição por produto químico em estudo (para os quatro modelos válidos de epiderme humana reconstruída: 3 min e 1 hora; para EpiSkin™ um tempo de exposição adicional de 4 horas). Em função do modelo de ensaio de epiderme humana reconstruída e do período de exposição avaliado, a temperatura de incubação durante a exposição pode variar entre a temperatura ambiente e 37 °C.

23. Cada ensaio deve utilizar amostras de controlo negativas e positivas em paralelo, a fim de demonstrar que a viabilidade (com controlos negativos), a função de barreira e a consequente sensibilidade (com o produto químico de controlo positivo) dos tecidos se situam dentro de um intervalo de aceitabilidade histórico definido. Os produtos químicos de controlo positivo propostos são o ácido acético glacial ou KOH 8 N, em função do modelo de epiderme humana reconstruída. É de notar que o KOH 8 N é um redutor direto do MTT e pode exigir controlos adaptados, como se descreve nos pontos 25 e 26. Os controlos negativos sugeridos são uma solução a 0,9 % (m/v) de NaCl ou água.

Medição da viabilidade celular

24. Deve utilizar-se o ensaio do MTT, quantitativo, para medir a viabilidade celular no âmbito do presente método (27). Coloca-se a amostra dos tecidos numa solução de MTT de concentração apropriada (0,3 ou 1 mg/ml), durante 3 horas. O precipitado azul de formazano é depois extraído do tecido com um solvente (por exemplo, isopropanol ou isopropanol acidificado), medindo-se a concentração de formazano por determinação da densidade ótica a 570 nm, utilizando um intervalo de banda de filtro de ± 30 nm, ou HPLC/espectrofotometria (ver pontos 30 e 31) (38).
25. Os produtos químicos em estudo podem interferir com o ensaio do MTT, por redução direta do MTT a formazano, de cor azul, e/ou por interferência das cores, se o produto químico em estudo absorver naturalmente, ou devido a processos de tratamento, na mesma gama de DO de formazano (570 \pm 30 nm, principalmente produtos químicos azuis e púrpura). Devem realizar-se controlos adicionais para detetar e corrigir uma possível interferência destes produtos químicos, como a redução não específica do MTT (NSMTT) e o controlo da cor não específico (NSC) (ver pontos 26-30). Este aspeto é especialmente importante se o produto químico em estudo não for completamente removido do tecido por lavagem ou penetrar na epiderme, estando presente nos tecidos quando é realizado o ensaio de viabilidade do MTT. Os PON para os modelos de ensaio (34) (35) (36) (37) contêm uma descrição pormenorizada do modo de correção da redução direta do MTT e das interferências de agentes corantes.
26. Para identificar os redutores diretos do MTT, adiciona-se cada produto químico em estudo a um meio MTT recentemente preparado (34) (35) (36) (37). Se a mistura de MTT que contém o produto químico em estudo se tornar azul/púrpura, considera-se que o produto químico em estudo reduz diretamente o MTT e é necessário realizar uma verificação funcional sobre epiderme não viável, independentemente da medição da absorvância normalizada ou do recurso à espectrofotometria HPLC/UPLC. Este controlo funcional complementar utiliza tecidos mortos que apenas possuem atividade metabólica residual, mas que absorvem o produto químico em estudo a uma taxa semelhante à dos tecidos viáveis. Cada substância química redutora do MTT é aplicada em, pelo menos, dois replicados dos tecidos sujeitos a ocisão por cada tempo de exposição, que devem ser submetidos a todo o ensaio de corrosão cutânea. A viabilidade real do tecido é então calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com os tecidos vivos expostos ao MTT, menos a percentagem de redução não específica do MTT, obtida com os tecidos occisados expostos ao mesmo redutor do MTT, em relação ao controlo negativo concomitante à correção do teste (% NSMTT).
27. Para identificar eventuais interferências de produtos em estudo químicos coloridos ou que adquirem cor quando entram em contacto com a água ou com isopropanol, e determinar a necessidade de controlos complementares, deve efetuar-se uma análise espectral do produto químico em estudo dissolvido em água (ambiente durante a exposição) e/ou em isopropanol (solução de extração). Se a solução do produto químico em estudo em água e/ou em isopropanol absorver luz na gama de 570 \pm 30 nm, devem efetuar-se novos controlos de corante ou,

em alternativa, recorrer à espectrofotometria HPLC/UPLC, caso em que estes controlos não são exigidos (ver pontos 30 e 31). Ao medir a absorvância-padrão, aplica-se o produto químico colorido em estudo que interfere em, pelo menos, dois tecidos replicados viáveis por cada período de exposição, os quais são sujeitos a um ensaio de corrosão integral da pele, mas são incubados num meio, em vez de o serem numa solução redutora do MTT, durante a fase de incubação do MTT, para se obter um controlo da cor não específico (NSC_{vivo}). O controlo do nível do NCS_{vivo} tem de ser realizado simultaneamente, ao longo do período de exposição, em cada série de ensaios, por produto químico colorido, devido à variabilidade biológica inerente dos tecidos vivos. A viabilidade real do tecido é então determinada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico suscetível de interferir no ensaio e incubados com a solução de MTT, menos a percentagem de cor não específica obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico que interfere no ensaio e incubados sem MTT, em simultâneo com a correção do ensaio (% de NCS_{vivo}).

28. Os produtos químicos em estudo identificados como provocando uma redução direta do MTT (ver ponto 26) e interferências de cor (ver ponto 27) exigirão igualmente um terceiro conjunto de controlos, para além dos controlos de NSMTT e NCS_{vivo} descritos nos pontos anteriores, aquando da medição da absorvância-padrão (DO). Tal é normalmente o caso dos produtos químicos de cor escura que interferem com o ensaio do MTT (por exemplo, de cor azul, púrpura ou preta), uma vez que a sua cor intrínseca impede a avaliação da capacidade de reduzirem diretamente o MTT, conforme descrito no ponto 26. Os produtos químicos em estudo podem ligar-se a tecidos vivos e sujeitos a occisão, pelo que o controlo do NSMTT permite não só corrigir uma potencial redução direta do MTT pelo produto químico em estudo, como também uma interferência de cor resultante da ligação do produto químico aos tecidos sujeitos a occisão. Pode, assim, obter-se uma dupla correção para as interferências de cor, uma vez que o controlo NCS_{vivo} corrige já as interferências de cor resultantes da ligação do produto químico em estudo aos tecidos vivos. Para evitar uma eventual dupla correção para a interferência da cor, é necessário realizar um terceiro controlo da cor não específico dos tecidos sujeitos a occisão («NSC_{morto}»). Neste controlo adicional, aplica-se o produto químico em estudo em, pelo menos, dois replicados dos tecidos sujeitos a occisão por período de exposição, replicados esses que são submetidos à totalidade do procedimento de ensaio, mas são incubados com meio durante a etapa de incubação com MTT, em vez da solução de MTT. Um único NSC_{morto} controlado é suficiente por produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou dos ensaios independentes realizados, mas deve ser realizado em conjunto com o controlo do NSMTT e, sempre que possível, com o mesmo lote de tecidos. A viabilidade real do tecido é então calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo menos a percentagem de NSMTT menos a percentagem de NCS_{vivo} mais a percentagem não específica obtida com tecidos mortos expostos ao produto químico em causa e incubados em meio sem MTT, calculada em relação à amostra do controlo negativo realizado em simultâneo com a correção do ensaio (% NSC_{morto}).
29. É importante assinalar que a redução não específica do MTT e as interferências de cor não específicas podem aumentar as leituras do extrato de tecido acima da gama de linearidade do espectrofotómetro. Nesta base, cada laboratório deve determinar a gama de linearidade do respetivo espectrofotómetro com o formazano (n.º CAS 57360-69-7), a partir de uma fonte comercial, antes de se iniciar o ensaio de produtos químicos para fins regulamentares. Considera-se que a medição da absorvância-padrão (DO) por recurso a um espectrofotómetro é adequada para avaliar os redutores diretos do MTT e os produtos químicos que interferem com os mesmos, se as DO dos extratos de tecidos obtidos com o produto químico em estudo, sem qualquer correção de redução direta do MTT e/ou da diminuição da cor se situarem na gama linear do espectrofotómetro ou se a percentagem de viabilidade não corrigida obtida com o produto químico em estudo já o tiver definido como corrosivo (ver pontos 35 e 36). No entanto, os resultados relativos aos produtos químicos em estudo que produzem %NSMTT e/ou % NCS_{vivo} > 50 % da amostra de controlo negativo devem ser interpretados com prudência.
30. No caso dos produtos químicos coloridos incompatíveis com a medição da absorvância-padrão (DO) devido a interferências demasiado fortes com o método MTT, pode recorrer-se ao método por espectrofotometria HPLC/UPLC para determinar o formazano (ver ponto 31) (37). A espectrofotometria HPLC/UPLC deteta a separação do formazano do produto químico em estudo antes da sua quantificação (38). Por este motivo, nunca são necessários controlos NSC_{vivo} ou NSC_{morto} quando se utiliza espectrofotometria HPLC/UPLC, independentemente do produto químico em estudo. Contudo, devem utilizar-se controlos NSMTT se se suspeitar que o produto químico em estudo reduz diretamente o MTT, ou se apresentar uma cor que impeça a avaliação da capacidade de reduzir diretamente o MTT (conforme descrito no ponto 26). Caso se utilize a espectrofotometria HPLC/UPLC para determinar o formazano, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como percentagem de todos os picos de formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em

relação a um pico obtido em paralelo com o controlo negativo. Para os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o MTT, a viabilidade dos tecidos é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo menos a percentagem de NSMTT. Por último, é de referir que não é possível avaliar os redutores diretos do MTT, passíveis de interferirem também com as cores, retidos nos tecidos após o tratamento e que reduzem o MTT de tal forma que conduzem a DO (utilizando a medida normal de DO) ou áreas de picos (utilizando espectrofotometria UPLC/HPLC) fora do intervalo de linearidade dos aparelhos, embora tais ocorrências sejam muito raras.

31. A espectrofotometria HPLC/UPLC pode também ser utilizada para a determinação de formazano com todos os tipos de produtos químicos em estudo (redutores de MTT ou não) (38). Devido à diversidade dos sistemas de espectrofotometria HPLC/UPLC, a qualificação do sistema de espectrofotometria HPLC/UPLC deve ser demonstrada antes da sua utilização para quantificar o formazano em extratos de tecidos através do cumprimento dos critérios de aceitação de um conjunto de parâmetros de qualificação normalizados baseados descritos na *U.S. Food and Drug Administration guidance for industry on bio-analytical method validation*. Estes parâmetros-chave e os respetivos critérios de aceitação constam do apêndice 4. Se forem cumpridos os critérios de aceitação definidos neste apêndice, considera-se o sistema de espectrofotometria HPLC/UPLC qualificado para medir o formazano nas condições experimentais descritas no presente método de ensaio.

Critérios de aceitabilidade

32. Para cada método de ensaio que utiliza modelos válidos de epiderme humana reconstruída, os tecidos tratados com o controlo negativo devem apresentar uma densidade ótica que reflita a qualidade dos tecidos descrita no quadro 2 e não estar abaixo dos limites históricos. Os tecidos tratados com o controlo positivo (ácido acético glacial ou KOH 8 N) devem refletir a capacidade de resposta a um produto químico corrosivo nas condições do modelo de teste (ver apêndice 2). A variabilidade entre os tecidos replicados do produto químico em estudo e/ou dos produtos químicos de controlo deve situar-se dentro dos limites aceites para cada modelo válido de epiderme humana reconstruída (ver apêndice 2); por exemplo, a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 30 %. Se o controlo, negativo ou positivo, estiver fora do intervalo aceites, a série de ensaios é considerada não qualificada e deve ser repetida. Se a variabilidade dos produtos químicos em estudo se situar fora do intervalo definido, os ensaios devem ser repetidos.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

33. Os valores de densidade ótica obtidos para cada produto químico em estudo devem ser utilizados para calcular a percentagem de viabilidade relativa ao controlo negativo, fixada em 100 %. Caso se recorra à espectrofotometria HPLC/UPLC, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como a percentagem de todos os picos de formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido em paralelo, com o controlo negativo. Os valores percentuais do limiar de viabilidade celular que distinguem os produtos químicos em estudo corrosivos dos não corrosivos (ou diferenciam subcategorias de produtos corrosivos) são definidos nos pontos 35 e 36 para cada um dos modelos de ensaio abrangidos por este método, e devem ser utilizados para interpretar os resultados.
34. Se a classificação resultante for inequívoca, deve bastar um único ensaio composto por, pelo menos, dois tecidos replicados para o produto químico em estudo. No entanto, em caso de resultados inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados), pode ponderar-se efetuar uma segunda série de ensaios, bem como uma terceira, se os resultados das duas primeiras séries forem discordantes.

35. O modelo de previsão do modelo de ensaio de corrosão cutânea EpiSkin™ (9) (34) (22), associado ao sistema de classificação GHS da ONU/CRE, é apresentado no quadro 4:

Quadro 4

Modelo de previsão de EpiSkin™

Viabilidade medida após o tempo de exposição (t = 3, 60 e 240 minutos)	Previsão a ter em conta
< 35 % após 3 min de exposição	Corrosivo: • Subcategoria facultativa 1A (*)
≥ 35 % após 3 min de exposição < 35 % após 60 min de exposição OU ≥ 35 % após 60 min de exposição < 35 % após 240 min de exposição	Corrosivo: • Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e 1C
≥ 35 % após 240 min de exposição	Não corrosivo

(*) De acordo com os dados gerados para avaliar a utilidade dos modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída, demonstrou-se que cerca de 22 % dos resultados da subcategoria 1A do modelo de teste EpiSkin™ podem, na realidade, inserir-se nas subcategorias 1B ou 1C de substâncias/misturas (constituindo, assim, sobreclassificações) (ver apêndice 3).

36. Os modelos de previsão para os modelos de ensaios de corrosão cutânea de EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), the SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36) e epiCS® (16)(23)(37), associados ao sistema de classificação GHS da ONU/CRE, são apresentados no quadro 5:

Quadro 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE e epiCS®

Viabilidade medida após o tempo de exposição (t = 3 e 60 minutos)	Previsão a ter em conta
ETAPA 1 para os métodos EpiDerm™ SCT, for SkinEthic™ RHE and epiCS®	
< 50 % após 3 min de exposição	Corrosivo
≥ 50 % após 3 min de exposição E < 15 % após 60 min de exposição	Corrosivo
≥ 50 % após 3 min de exposição E ≥ 15 % após 60 min de exposição	Não corrosivo
ETAPA 2 para o método EpiDerm™ SCT — para substâncias/misturas identificadas como corrosivas na etapa 1	
< 25 % após 3 min de exposição	Subcategoria facultativa 1A*

Viabilidade medida após o tempo de exposição (t = 3 e 60 minutos)	Previsão a ter em conta
ETAPA 1 para os métodos EpiDerm™ SCT, for SkinEthic™ RHE and epiCS®	
≥ 25 % após 3 min de exposição	Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e 1C
ETAPA 2 para SkinEthic™ RHE — para substâncias/misturas identificadas como corrosivas na etapa 1	
< 18 % após 3 min de exposição	Subcategoria facultativa 1A*
≥ 18 % após 3 min de exposição	Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e 1C
ETAPA 2 para epiCS® — para substâncias/misturas identificadas como corrosivas na etapa 1	
< 15 % após 3 min de exposição	Subcategoria facultativa 1A*
≥ 15 % após 3 min de exposição	Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e 1C

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

37. Para cada ensaio, devem ser apresentados num quadro os dados respeitantes a cada replicado de tecido (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. Além disso, devem ser comunicados os meios e intervalos de viabilidade e os CV entre os tecidos replicados, para cada ensaio. Para cada produto químico em estudo, devem indicar-se as interações observadas com o reagente MTT por redutores diretos deste ou por produtos químicos com cor.

Relatório de ensaio

38. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo

- Substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;
- Substância multicomponentes, UVCB e mistura: caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes;
- Aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- Proveniência, número do lote, se disponíveis;
- Tratamento do produto químico em estudo/substância de controlo antes do ensaio, se for o caso;
- Estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas.

— Condições de armazenagem.

Modelo de epiderme humana reconstruída, protocolo utilizado e fundamentação do mesmo (se aplicável)

Condições de realização do ensaio

— Modelo de epiderme humana reconstruída utilizado (incluindo número do lote);

— Informações sobre a calibração do dispositivo de medição (por exemplo, espectrofotómetro), o comprimento de onda e a gama de comprimentos de onda (se pertinente) utilizados para a quantificação do MTT formazano, e o intervalo de linearidade do dispositivo de medição;

— Descrição do método utilizado para quantificar o MTT formazano;

— Descrição da qualificação do sistema de sistema de espectrofotometria HPLC/UPLC, se pertinente;

— Informações completas que substanciem o modelo específico de epiderme humana reconstruída utilizado, incluindo dados sobre o desempenho do mesmo. Tal deve incluir, nomeadamente, o seguinte:

i) Viabilidade;

ii) Função de barreira;

iii) Morfologia;

iv) Capacidade de reprodutibilidade e de previsão;

v) Controlos de qualidade (CQ) do modelo;

— Referência a dados anteriormente publicados sobre o modelo; tal deve incluir, nomeadamente, o seguinte Aceitabilidade dos dados de controlo de qualidade relativamente a dados históricos de lotes;

— Demonstração da competência na execução do método de ensaio antes da sua utilização por rotina através do ensaio das substâncias de referência.

Procedimento de ensaio

— Pormenores sobre o procedimento de ensaio utilizado (incluindo procedimentos de lavagem utilizados após o período de exposição);

— Doses do produto químico em estudo e dos produtos químicos de controlo utilizados;

— Duração do(s) período(s) de exposição e temperatura(s) de exposição;

— Indicação dos controlos utilizados nos redutores diretos do MTT e/ou dos produtos químicos em estudo que apresentem coloração, se aplicável;

- Número de replicados de tecidos utilizados por cada produto químico em estudo e de controlo (CP, controlo negativo, NSMTT e NSC-vivo e NSC-morto, se aplicável), por período de exposição;
- Descrição do modelo de critérios/previsão de decisão aplicado com base no modelo de epiderme humana reconstruída utilizado;
- Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio (incluindo os procedimentos de lavagem).

Crítérios de aceitação de série de ensaios e de ensaios

- Valores médios dos controlos positivos e negativos e intervalos de aceitação com base em dados históricos;
- Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados para os controlos positivos e negativos;
- Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados para o produto químico em estudo.

Resultados

- Quadro com os dados correspondentes aos produtos químicos em estudo e aos controlos, para cada período de exposição, cada série de ensaios e cada série e cada medição de replicados, incluindo a densidade ótica (DO) ou a zona do pico do formazano, a percentagem de viabilidade dos tecidos, a percentagem média de viabilidade dos tecidos, diferenças entre os replicados, ou, se for caso disso, DP e/ou CV;
- Quadro com os dados correspondentes aos produtos químicos em estudo e aos controlos, para cada período de exposição, cada série de ensaios e cada série e cada medição de replicados, incluindo a densidade ótica (DO) ou a zona do pico do formazano, a percentagem de viabilidade dos tecidos, a percentagem média de viabilidade dos tecidos, diferenças entre os replicados, ou, se for caso disso, DP e/ou os CV;
- Resultados obtidos com o(s) produto(s) químico(s) em estudo e produtos químicos de controlo à luz dos critérios de aceitação de ensaios e séries de ensaios definidos;
- Descrição de outros efeitos eventualmente observados;
- Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ONU (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»
- (3) Capítulo B.40 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*».

- (4) Capítulo B.65 deste anexo: «Método de ensaio da membrana de estanquidade *in vitro*»
- (5) Capítulo B.46 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Método de ensaio em epiderme humana reconstruída».
- (6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 12:483-524.
- (10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- (11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129-147.
- (12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925-929.

- (17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547-559.
- (18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.
- (19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.
- (20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.
- (21) OCDE (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.
- (23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.
- (24) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (25) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.
- (27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- (28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.
- (30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211 - 225.

- (31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.
- (32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.
- (33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.
- (34) EpiSkin™ SOP (December 2011). INVITTOX Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.
- (36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). INVITTOX Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
- (38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Disponível em: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Adequação: Relação do método de ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o método de ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (25).

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 muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de produtos químicos testados que são corretamente classificados como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência do produto químico em estudos positivos para o tipo de produto químico em estudo (25).

Controlo NSC_{morto}: Controlo de cor não específico em tecidos mortos.

Controlo NSC_{vivo}: Controlo da cor não específico nos tecidos vivos.

Corrosão da pele *in vivo*: Produção de danos irreversíveis à pele, nomeadamente a necrose visível da epiderme, prolongando-se para a derme, após a aplicação de um produto químico em estudo durante um máximo de quatro horas. As reações corrosivas típicas são úlceras, sangramento, crostas ensanguentadas e, após o período de observação de 14 dias, empalidecimento devido à descoloração da pele, áreas alargadas de alopecia e cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser esclarecidas por métodos histopatológicos.

CP: Controlo positivo, replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

DO: Densidade ótica.

Dose infinita: Quantidade de produto químico em estudo aplicada à epiderme que excede a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície da epiderme.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de 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 (25).

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 (25).

ET₅₀: 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 IC₅₀.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (25).

GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos): Sistema 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 correspondentes elementos de comunicação, 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).

HPLC: Cromatografia líquida de alta resolução.

IATA: Abordagem integrada de ensaio e avaliação.

IC₅₀: Pode estimar-se através da determinação da concentração à qual um produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (IC₅₀) após um tempo de exposição fixo, ver também ET₅₀.

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem.

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo.

NC: Não corrosivo.

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. Incluem: (i) componentes essenciais do método de ensaio; (ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (iii) níveis de fiabilidade e exatidão semelhantes, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (25).

NSMTT: Redução não específica do MTT.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de 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 (25).

Série de ensaios: Uma série de ensaios consiste no ensaio de um ou mais produtos químicos em estudo em simultâneo com um controlo negativo e um controlo positivo.

Substância: um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração $> 10\%$ (m/m) e $< 80\%$ (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

UPLC: Cromatografia líquida de muito alta resolução.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

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 MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-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.

Apêndice 2

PRINCIPAIS COMPONENTES DOS MODELOS DE ENSAIO RHE VALIDADOS PARA ENSAIOS DE CORROSÃO

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	eptCS®
Superfície do modelo	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Número de tecidos replicados	Pelo menos 2 por período de exposição	2-3 por período de exposição	Pelo menos 2 por período de exposição	Pelo menos 2 por período de exposição
Doses e aplicação do tratamento	<p><u>Líquidos e viscosos:</u> 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²)</p> <p><u>Sólidos:</u> 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl de solução de NaCl (9 g/l)</p> <p><u>Cerosos/aderentes:</u> 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) com uma malha de nylon</p>	<p><u>Líquidos:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²), com ou sem malha de nylon</p> <p><u>Compatibilidade do produto químico com a malha de nylon antes do ensaio</u></p> <p><u>Semissólidos:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²)</p> <p><u>Sólidos:</u> 25 µl H₂O (ou mais, se necessário) + 25 mg (39,7 mg/cm²)</p> <p><u>Ceras:</u> peça achatada em forma de disco com cerca de 8 mm de diâmetro colocada sobre o tecido humedecido com 15 µl H₂O.</p>	<p><u>Líquidos e viscosos:</u> 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) com malha de nylon</p> <p><u>Compatibilidade do produto químico com a malha de nylon antes do ensaio</u></p> <p><u>Sólidos:</u> 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²)</p> <p><u>Cerosos/aderentes:</u> 203 mg (40 mg/cm²) com malha de nylon</p>	<p><u>Líquidos:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) com malha de nylon</p> <p><u>Compatibilidade do produto químico com a malha de nylon antes do ensaio</u></p> <p><u>Semissólidos:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²)</p> <p><u>Sólidos:</u> 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (ou mais, se necessário)</p> <p><u>Cerosos:</u> peça achatada em forma de bolacha com cerca de 8 mm de diâmetro colocada sobre o tecido humedecido com 15 µl H₂O.</p>

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Controlo prévio para redução direta do MTT	50 µl (líquido) ou 20 mg (sólido) +2 ml de MTT Solução de 0,3 mg/ml por 180 ± 5 min a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % HR → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados à água	50 µl (líquido) ou 25 mg (sólido) 1 ml de MTT Solução de 1 mg/ml por 60 min a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % HR → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados.	40 µl (líquido) ou 20 mg (sólido) 1 ml de MTT Solução de 1 mg/ml 180 ± 15 min a 37 °C, 5 % de CO ₂ , 95 % RH → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados.	50 µl (líquido) ou 25 mg (sólido) 1 ml de MTT Solução de 1 mg/ml por 60 min a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % HR → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados.
Controlo prévio para interferência de cor	10 µl (líquido) ou 10 mg (sólido) + 90 µl H ₂ O misturados durante 15 minutos à temperatura ambiente → se a solução adquirir cor, devem ser efetuados controlos vivos adaptados	50 µl (líquido) ou 25 mg (sólido) +300 µl H ₂ O durante 60 minutos a 37 °C, 5 % de CO ₂ , 95 % HR → se a solução adquirir cor, devem ser efetuados controlos vivos adaptados	40 µl (líquido) ou 20 mg (sólido) +300 µl H ₂ O misturados durante 60 minutos à temperatura ambiente → se o produto químico em estufo for corado, devem ser efetuados controlos adaptados ao nível de vida	50 µl (líquido) ou 25 mg (sólido) +300 µl H ₂ O durante 60 minutos a 37 °C, 5 % de CO ₂ , 95 % HR → Se a solução adquirir cor, devem ser efetuados controlos vivos adaptados
Tempo e temperatura de exposição	3 min, 60 min (±5 min) e 240 min (±10 min) Câmara ventilada Temperatura ambiente (TA, 18-28 °C)	3 minutos à temperatura ambiente e nos 60 min a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % HR	3 minutos à temperatura ambiente e nos 60 min a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % HR	3 minutos à temperatura ambiente e nos 60 min a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % HR
Enxaguamento	25 ml 1x PBS (2 ml/lançamento)	20 vezes com um fluxo suave e constante de 1x PBS	20 vezes com um fluxo suave e constante de 1x PBS	20 vezes com um fluxo suave e constante de 1x PBS

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Amostra de controlo negativo	50 µl de solução de NaCl (9 g/l) Testados com cada tempo de exposição	50 µl H ₂ O Testados com cada tempo de exposição	40 µl H ₂ O Testados com cada tempo de exposição	50 µl H ₂ O Testados com cada tempo de exposição
Amostra de controlo positivo	50 µl de ácido acético glacial Testado apenas durante 4 horas	50 µl de KOH 8 N Testado com cada tempo de exposição	40 µl de KOH 8 N Testado apenas durante 1 hora	50 µl de KOH 8 N Testado com cada tempo de exposição
Solução de MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Tempo de incubação e temperatura do MTT	180 min (± 15 min) a 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min (±15 min) a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min a 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % RH
Solvente de extração	500 µl de isopropanol acidificado (0,04 N HCl em isopropanol) (tecidos isolados totalmente imersos)	2 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção)	1,5 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção)	2 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção)
Tempo e temperatura de extração	De um dia para o outro, à temperatura ambiente, protegido da luz	De um dia para o outro, sem agitar, à temperatura ambiente, ou, agitando, (~ 120 rpm), à temperatura ambiente	De um dia para o outro, sem agitar, à temperatura ambiente, ou, agitando, (~ 120 rpm), à temperatura ambiente	De um dia para o outro, sem agitar, à temperatura ambiente, ou, agitando, (~ 120 rpm), à temperatura ambiente

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Leitura da densidade ótica	570 nm (545-595 nm) sem filtro de referência	570 nm (ou 540 nm) sem filtro de referência	570 nm (540-600 nm) sem filtro de referência	540-570 nm sem filtro de referência
Controlo da qualidade dos tecidos	18 horas de tratamento com SDS 1,0 mg/ml \leq IC ₅₀ \leq 3,0 mg/ml	Tratamento com 1 % Triton X-100 4,08 horas \leq ET ₅₀ \leq 8,7 horas	Tratamento com 1 % Triton X-100 4,0 horas \leq ET ₅₀ \leq 10,0 horas	Tratamento com 1 % Triton X-100 2,0 horas \leq ET ₅₀ \leq 7,0 horas
Critérios de aceitabilidade	<p>1. A densidade ótica média dos replicados tratados com o controlo negativo (NaCl) deve ser \geq 0,6 e \leq 1,5 para todos os tempos de exposição.</p> <p>2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 4 horas com controlo positivo (ácido acético glacial), expressa em % do controlo negativo, deve ser \leq 20 %</p> <p>3. No intervalo de viabilidade de 20-100 % e para densidades óticas \geq 0,3, a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 30 %.</p>	<p>1. A densidade ótica média dos replicados tratados com o controlo negativo (H₂O) deve ser \geq 0,8 e \leq 2,8 para todos os tempos de exposição.</p> <p>2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 1 hora com controlo positivo (KOH 8 N), expressa em % do controlo negativo, deve ser $<$ 15 %.</p> <p>3. No intervalo de viabilidade de 20-100 %, o coeficiente de variação (CV) entre os tecidos replicados deve ser \leq 30 %.</p>	<p>1. A densidade ótica média dos replicados tratados com o controlo negativo (H₂O) deve ser \geq 0,8 e \leq 3,0 para todos os tempos de exposição.</p> <p>2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 1 hora com controlo positivo (KOH 8 N), expressa em % do controlo negativo, deve ser $<$ 15 %.</p> <p>3. No intervalo de viabilidade de 20-100 % e para densidades óticas \geq 0,3, a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 30 %.</p>	<p>1. A densidade ótica média dos replicados tratados com o controlo negativo (H₂O) deve ser \geq 0,8 e \leq 2,8 para todos os tempos de exposição.</p> <p>2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 1 hora com controlo positivo (KOH 8 N), expressa em % do controlo negativo, deve ser $<$ 20 %.</p> <p>3. No intervalo de viabilidade de 20-100 % e para densidades óticas \geq 0,3, a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 30 %.</p>

Apêndice 3

DESEMPENHO DOS MODELOS DE ENSAIO PARA SUBCATEGORIZAÇÃO

O quadro seguinte apresenta os desempenhos dos quatro modelos de ensaio, calculados a partir de um conjunto de 80 produtos químicos testados pelos quatro concetores dos ensaios. Os cálculos foram efetuados pelo Secretariado da OCDE, analisados e aprovados por um subgrupo de peritos (21) (23).

Os modelos de ensaio EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ and epiCS® permitem classificar em subcategorias (ou seja, 1A versus 1B e 1C versus NC)

Desempenhos, taxas de sobreclassificação, taxas de subclassificação e exatidão (capacidade de previsão) dos quatro modelos de ensaio, a partir de um conjunto de 80 produtos químicos, todos testados em mais de 2 ou 3 séries de ensaios com cada modelo de ensaio:

ESTATÍSTICAS SOBRE AS PREVISÕES OBTIDAS RELATIVAMENTE AO CONJUNTO DE PRODUTOS QUÍMICOS				
(n = 80 produtos químicos testados em 2 séries de ensaios independentes com epiderme humana reconstruída epiCS® ou 3 ensaios independentes com epiderme humana reconstruída EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ and SkinEthic™, ou seja, respetivamente 159 (*) ou 240 classificações)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Sobreclassificações:				
1B e 1C mais sobreclassificados do que 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC mais sobreclassificado do que 1B e 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC mais sobreclassificado do que 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Corrosivo sobreclassificado	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Taxa global de sobreclassificação (todas as categorias)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Subclassificações:				
1A menos sobreclassificado do que 1B e 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A menos sobreclassificado do que NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B e 1C menos sobreclassificado do que NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Taxa global de subclassificação (todas as categorias)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Classificações corretas:				
1A corretamente classificada	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B e 1C corretamente classificadas	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC corretamente classificado	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Exatidão global	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NC: Não corrosivo

(*) um produto químico foi testado uma vez em epiCS® devido à ausência de disponibilidade (23)

Apêndice 4

Parâmetros fundamentais e critérios de aceitação para a qualificação de um sistema de HPLC/UPLC–espectrofotometria para a medição de formazano extraído de epiderme humana reconstruída

Parâmetro	Protocolo derivado do documento de orientação da FDA (37) (38)	Critérios de aceitação
Seletividade	Análise do isopropanol, branco vivo (extração de isopropanol de tecidos vivos de epiderme humana reconstruída sem qualquer tratamento), branco morto (extração de isopropanol de tecidos mortos de epiderme humana reconstruída sem qualquer tratamento)	$Area_{interferência} \leq 20 \% \text{ of } Area_{LLOQ}^{(1)}$
Precisão	Controlos de qualidade (MTT formazano a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) em isopropanol (n = 5)	$CV \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ para o LLOQ}$
Exatidão	Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	$\% \text{ Dev } \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ para LLOQ}$
Efeito matriz	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 5)	$85 \% \leq \text{Efeitos Matriz } \% \leq 115 \%$
Passagem	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ ² (2)	$Area_{interferência} \leq 20 \% \text{ of } Area_{LLOQ}$
Reprodutibilidade (intra-diária)	3 curvas de calibração independentes (com base em 6 diluições consecutivas de 1/3 de MTT formazano em isopropanol, com início em ULOQ, isto é, 200 µg/ml); Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curvas de calibração: $\% \text{ Dev } \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ para LLOQ}$ Controlos de qualidade: $\% \text{ Dev } \leq 15 \% \text{ e } CV \leq 15 \%$
Reprodutibilidade (intra-diária)	Dia 1: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 2: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 3: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3)	
Estabilidade a curto prazo do MTT formazano em extratos de tecidos de epiderme humana reconstruída	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), análise no dia da preparação e após 24 horas de armazenagem à temperatura ambiente.	$\% \text{ Dev } \leq 15 \%$
Estabilidade a longo prazo do MTT formazano em extratos de tecidos de epiderme humana reconstruída, se necessário	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), análise no dia da preparação e após vários dias de armazenagem a uma temperatura especificada (p. ex., 4 °C, — 20 °C, — 80 °C)	$\% \text{ Dev } \leq 15 \%$

(1) LLOQ: Limite inferior de quantificação, definido de forma a abranger 1-2 % de viabilidade dos tecidos, ou seja, 0,8 µg/ml.

(2) ULOQ: Limite superior de quantificação, definido para ser duas vezes superior à mais elevada concentração de formazano em extratos de isopropanol de controlos negativos, isto é, 200 µg/ml.

(7) Na parte B, 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. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 439 (2015) da OCDE. 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 das Nações Unidas (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 da União Europeia (UE) ⁽¹⁾]. O presente método de ensaio descreve um procedimento *in vitro* que pode ser utilizado para identificar os perigos associados a produtos químicos (substâncias e misturas) irritantes, da categoria 2 dos sistemas GHS da ONU e CRE da UE (2). Pode também ser utilizado para identificar produtos químicos não classificados nas regiões que não adotem a categoria 3 – facultativa – do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros). Assim, consoante o quadro regulamentar e o sistema de classificação utilizado, o presente método pode ser utilizado para determinar o poder de irritação cutânea dos produtos químicos, quer como ensaio independente alternativo de estudos de irritação cutânea *in vivo* ou como ensaio parcial alternativo no âmbito de uma estratégia de ensaio (3).
2. A determinação da irritação cutânea utiliza normalmente animais de laboratório [método de ensaio 4, equivalente à *Test Guideline* 404 da OCDE, adotada em 1981 e revista em 1992, 2002 e 2015] (4). Para o ensaio de corrosividade, foram adotados pela UE três métodos de ensaio *in vitro* validados, designadamente os métodos de ensaio B.40 (equivalente à *Test Guideline* 430 da OCDE), B.40-A (equivalente à *Test Guideline* 431 da OCDE) e B.65 (equivalente à *Test Guideline* 435 da OCDE) (5) (6) (7). Um documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA) para a corrosão e irritação da pele descreve vários módulos que agrupam diversas fontes de informação e instrumentos de análise e fornece orientações sobre (i) como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não provenientes de ensaios para a avaliação dos potenciais de irritação e de corrosão cutâneas dos produtos químicos e (ii) propõe uma abordagem quando há necessidade de ensaios complementares (3).
3. O presente método de ensaio incide na irritação cutânea no ser humano. Baseia-se no sistema de ensaio *in vitro* de epiderme humana reconstruída, que reproduz com rigor as propriedades bioquímicas e fisiológicas das camadas superiores da pele humana, isto é, da epiderme. O sistema de ensaio de epiderme humana reconstruída utiliza queratinócitos humanos derivados, não transformados, como fonte de células para reconstruir um modelo epidérmico com histologia e citoarquitetura representativas. Existem normas de desempenho (ND) para facilitar a validação e a avaliação de métodos similares e modificados de ensaio de epiderme humana reconstruída, em conformidade com os princípios do documento de orientação 34 da OCDE (8) (9). A diretriz de ensaio correspondente foi adotada em 2010, atualizada em 2013 – a fim de incluir os modelos adicionais de epiderme humana reconstruída – e novamente atualizada em 2015, para ter em conta o documento de orientação da IATA e introduzir um procedimento alternativo para a determinação da viabilidade.
4. Foram realizados estudos de pré-validação, otimização e validação para quatro modelos de ensaio *in vitro* comercialmente disponíveis (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) com base no sistema de ensaio de epiderme humana reconstruída (sensibilidade 80 %, especificidade 70 % e exatidão 75 %). Estes quatro modelos de ensaio estão incluídos no presente e constam da lista do apêndice 2, que também fornece informações sobre o tipo de estudo de validação utilizado para validar os respetivos métodos de ensaio. Conforme se indica no apêndice 2, utilizou-se o método de referência validado (MRV) para elaborar o presente método de ensaio e as normas de desempenho (8).
5. A aceitação mútua de dados nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida no caso de métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho (8), se estes métodos tiverem sido analisados e adotados pela OCDE. Os modelos incluídos neste método de ensaio, bem como a correspondente *Test Guideline*, podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as necessidades dos países em matéria de ensaios com métodos *in vitro* de irritação cutânea, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados.
6. O apêndice 1 apresenta as definições dos termos utilizados no presente documento.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

7. Uma das limitações do presente método de ensaio, comprovada por estudos prospetivos de validação que avaliam e caracterizam métodos de ensaio de epiderme humana reconstruída (16), reside no facto de não permitir a subcategorização de produtos químicos na categoria facultativa 3 (irritantes ligeiros) do GHS da ONU. Por conseguinte, o quadro regulamentar dos Estados-Membros decidirá o modo como será aplicado. No caso da UE, a categoria 3 não foi incluída no CRE. Para uma avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica, deve consultar-se o documento de orientações da OCDE relativo a abordagens integradas de ensaio e avaliação da OCDE (3). É sabido que a utilização de pele humana está sujeita a condições e argumentos nacionais e internacionais de natureza ética.

⁽¹⁾ 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).

8. O presente método de ensaio incide na irritação cutânea no ser humano; embora não forneça informações adequadas sobre a corrosão da pele, importa referir que o método de ensaio B.40-A (equivalente à *Test Guideline* 431 da OCDE), sobre a corrosão cutânea, se baseia no mesmo sistema de ensaio de epiderme humana reconstruída, embora utilize outro protocolo (6). O presente método baseia-se em modelos de epiderme humana reconstruída com queratinócitos humanos, o que representa, portanto, *in vitro*, o órgão-alvo da espécie em causa. O método cobre ainda, diretamente, a fase inicial do mecanismo de ação/o processo inflamatório (das células 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 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 na água. Sempre que possível, os sólidos devem ser moídos em pó fino antes da aplicação; nenhum outro tratamento prévio da amostra é necessário. O estudo de validação ainda não incidiu em gases e aerossóis (29). Embora se possa considerar que estes podem ser ensaiados por recurso à tecnologia da epiderme humana reconstruída, o método de ensaio atual não permite o ensaio de gases e aerossóis.
9. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura, para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura. No entanto, uma vez que as misturas abrangem uma vasta gama de categorias e composições e que, na atualidade, se dispõe de informações limitadas sobre a análise das mesmas, nos casos em que puder ser demonstrada a inaplicabilidade do método de ensaio a uma categoria específica de misturas (por exemplo, na sequência de uma estratégia como a proposta por Eskes *et al.*, 2012) (18), o método não deve ser utilizado para essa categoria específica de misturas. Deve ter-se o mesmo cuidado caso se observem determinadas propriedades químicas ou físico-químicas específicas incompatíveis com o método de ensaio.
10. Os produtos químicos que absorvem luz na mesma gama que o MTT-formazano, bem como os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o corante vital MTT (MTT-formazano), podem interferir nas determinações da viabilidade das células e requerer o recurso a controlos adaptados para correções (ver pontos 28 a 34).
11. Quando a classificação do produto químico em estudo é inequívoca, basta geralmente 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 % \pm 5 %), é de ponderar a realização de uma segunda série de ensaios, bem como de uma terceira, se os resultados das duas primeiras forem discordantes.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

12. 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 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*.
13. A irritação cutânea induzida por produtos químicos, manifestada principalmente por eritema e edema, resulta de uma cascata de eventos que se inicia com a penetração das substâncias químicas através do *stratum corneum*, onde podem danificar as camadas subjacentes de queratinócitos e de outras células da pele. As células danificadas podem liberar mediadores inflamatórios ou induzir uma cascata inflamatória que também atua sobre as células da derme, particularmente o estroma e células endoteliais dos vasos sanguíneos. A dilatação e permeabilidade crescente das células endoteliais originam o eritema e o edema observados (29). Nomeadamente, os métodos de ensaios baseados na ausência de vascularização no sistema de ensaio *in vitro* avaliam os eventos que dão início à cascata – por exemplo, danos nas células/tecidos (16) (17) –, utilizando a viabilidade celular como leitura.
14. A viabilidade celular nos modelos de epiderme humana reconstruída é medida pela conversão enzimática do corante vital MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo, n.º CAS 298-93-1] num sal de azul de formazano, que é determinado quantitativamente depois de extraído dos tecidos (31). Os produtos químicos irritantes são identificados com base na sua capacidade de redução da viabilidade celular para valores inferiores a determinados limites (\leq 50 % no caso das substâncias irritantes classificadas na categoria 2 dos sistemas GHS da ONU e CRE da UE). Consoante o quadro regulamentar e a aplicabilidade do método de ensaio, os produtos químicos que produzam viabilidades celulares acima do limiar definido podem ser considerados não irritantes ($>$ 50 %, sem categoria).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

15. Antes de utilizarem de forma rotineira qualquer dos quatro modelos de ensaio validados que seguem este método de ensaio (apêndice 2), os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, utilizando para o efeito as dez substâncias de base enumeradas no quadro 1. No caso de, por exemplo, uma substância incluída na lista estar indisponível, ou sempre que se justifique, pode utilizar-se outra substância para a qual se disponha de dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro* – por exemplo, da lista de produtos químicos de referência (8) –, desde que sejam aplicados os critérios de seleção descritos no quadro 1. A utilização de uma substância de referência alternativa deve ser justificada.
16. No âmbito do ensaio de proficiência, recomenda-se que o utilizador verifique, após a receção dos tecidos, as propriedades de barreira dos mesmos, especificadas pelo produtor do modelo de epiderme humana reconstruída. Este aspeto é de especial importância se os tecidos forem expedidos a longas distâncias ou demorarem muito tempo a chegar. A partir do momento em que um método de ensaio esteja implantado e tenha sido adquirida e demonstrada competência para utilizá-lo, não é necessário efetuar por rotina a referida verificação. Recomenda-se, contudo, que, ao utilizar um método de ensaio, se continue a avaliar periodicamente as propriedades de barreira.

Quadro 1

Substâncias para a demonstração de competência ⁽¹⁾

Substância	N.º de registo CAS	Pontuação <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Estado físico	Categoria do sistema GHS da ONU
SUBSTÂNCIAS NÃO CLASSIFICADAS (sem categoria no sistema GHS da ONU)				
Ácido naftalenoacético	86-87-3	0	Sólido	Nenhuma categoria
Isopropanol	67-63-0	0,3	Líquido	Nenhuma categoria
Estearato de metilo	112-61-8	1	Sólido	Nenhuma categoria
Butirato de heptilo	5870-93-9	1,7	Líquido	Nenhuma categoria (Categoria facultativa 3) ⁽³⁾
Salicilato de hexilo	6259-76-3	2	Líquido	Nenhuma categoria (Categoria facultativa 3) ⁽³⁾
SUBSTÂNCIA CLASSIFICADAS (categoria 2 do sistema GHS da ONU)				
Ciclamenaldeído	103-95-7	2,3	Líquido	Cat. 2
1-Bromo-hexano	111-25-1	2,7	Líquido	Cat. 2
Hidróxido de potássio (solução aquosa a 5 %)	1310-58-3	3	Líquido	Cat. 2
1-Metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3,3	Sólido	Cat. 2
Heptanol	111-71-7	3,4	Líquido	Cat. 2

⁽¹⁾ As substâncias para a demonstração de competência são um subconjunto das substâncias utilizadas no estudo de validação; a seleção é baseada nos seguintes critérios: as substâncias químicas (i) estão disponíveis no comércio; (ii) são representativas de toda a gama da escala de irritação de Draize (de não irritante a fortemente irritante); (iii) têm uma estrutura química bem definida; (iv) são representativas ao nível da funcionalidade química utilizada no processo de validação; (v) apresentaram resultados reprodutíveis *in vitro* em múltiplos ensaios e em múltiplos laboratórios; (vi) têm uma boa previsibilidade *in vitro*, e (vii) não estão associadas a um perfil extremamente tóxico (por exemplo, cancerígeno ou tóxico para o sistema reprodutivo) nem a custos de eliminação proibitivos.

⁽²⁾ Pontuação *in vivo* ao abrigo do método de ensaio B.4 (4);

⁽³⁾ No âmbito do presente método, a categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros) (1) é referida como «nenhuma categoria».

PROCEDIMENTO

17. Segue-se uma descrição dos componentes e procedimentos de um método de ensaio de epiderme humana reconstruída para efeitos de avaliação da irritação cutânea (ver também o apêndice 3 no que se refere a parâmetros relativos a cada modelo de ensaio). Existem procedimentos operacionais normalizados para os quatro modelos conformes a este método de ensaio (32) (33) (34) (35).

COMPONENTES DO MÉTODO DE ENSAIO DE EPIDERME HUMANA RECONSTITUÍDA

Condições gerais

18. 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 último deve ter várias camadas e possuir um perfil lipídico que permita estabelecer uma barreira funcional suficientemente robusta para resistir à penetração rápida de produtos químicos marcadores citotóxicos – por exemplo, SDS ou Triton X-100. A função de barreira deve ser demonstrada e pode avaliar-se determinando a concentração à qual o produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (CI50) após um tempo de exposição fixo, ou determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 % (ET50), mediante a aplicação do produto químico de referência a uma concentração específica e fixa. 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*

19. O ensaio utilizado para quantificar a viabilidade é o ensaio MTS (31). As células viáveis do tecido de epiderme humana reconstruída podem reduzir o corante MTT a um precipitado azul de formazano que é depois extraído do tecido com isopropanol (ou solvente semelhante). A densidade ótica do solvente de extração isolado deve ser suficientemente baixa (< 0,1). O formazano extraído pode ser quantificado utilizando um método de medição da absorvância normalizado ou por espectrofotometria HPLC/UPLC (36). Os utilizadores do modelo de epiderme humana reconstruída devem garantir que cada lote de epiderme humana reconstruída utilizado preenche os critérios de controlo negativo. O concetor/fornecedor da epiderme humana reconstruída estabeleceu um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para os valores de densidade ótica dos controlos negativos (nas condições aplicáveis ao método de ensaio de irritação cutânea). Indicam-se no quadro 2 os intervalos de aceitabilidade validados para os quatro modelos de epiderme humana reconstruída que se incluem neste método de ensaio. Os utilizadores de espectrofotometria HPLC/UPLC devem utilizar as gamas de controlo negativo da densidade ótica indicadas no quadro 2 como critério de aceitação para o controlo negativo. 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 de controlos negativos dos modelos de ensaio incluídos no presente método de ensaio**

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Função de barreira

20. O *stratum corneum* e a sua composição lipídica devem ser suficientes para resistir a uma penetração rápida de certos produtos químicos marcadores citotóxicos (por exemplo, SDS ou Triton X-100), estimada com base na IC₅₀ ou no ET₅₀ (quadro 3).

Morfologia

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

Reprodutibilidade

22. Os resultados dos controlos positivos e negativos do método de ensaio devem demonstrar reprodutibilidade ao longo do tempo.

Controlo de qualidade

23. O modelo de epiderme humana reconstruída só deve ser utilizado se o concetor/fornecedor demonstrar que cada lote do modelo de epiderme humana reconstruída satisfaz determinados critérios de aptidão para a produção, de entre os quais os de *viabilidade* (ponto 19), *função de barreira* (ponto 20) e *morfologia* (ponto 21) são os mais relevantes. Estes dados devem ser facultados aos utilizadores do método de ensaio, para que possam fazer constar tais informações dos seus relatórios. O concetor/fornecedor de epiderme humana reconstruída estabelece um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para IC₅₀ ou ET₅₀. Apenas podem ser utilizados com fiabilidade na previsão de classificações de irritação resultados obtidos com tecidos que possuam as características exigidas. Apresentam-se no quadro 3 os intervalos de aceitabilidade para os quatro modelos de ensaio incluídos no presente método.

Quadro 3

Crítérios de controlo de qualidade para a liberação dos lotes dos modelos de ensaio incluídos no presente método de ensaio

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamento com SDS)(32)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET ₅₀ = 4,0 horas	ET ₅₀ = 8,7 horas
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 horas	ET ₅₀ = 10,0 horas
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 horas de tratamento com SDS)(35)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

Aplicação dos produtos químicos em estudo e de controlo

24. 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 dos produtos líquidos como dos sólidos, deve aplicar-se uma quantidade do produto químico em estudo suficiente para cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando uma dose infinita, ou seja, entre 26 e 83 µl/cm² (ver apêndice 3). 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 e a superfície da epiderme. Sempre que possível, os sólidos devem ser ensaiados na forma de pó fino. Em alguns casos, pode ser utilizada uma malha de *nylon* para ajudar a espalhar (ver apêndice 3). 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 os modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída utilizados, o período de exposição varia entre 15 e 60 minutos, e a temperatura de incubação entre 20 e 37 °C. Estes períodos de exposição e as temperaturas são otimizados para cada método de ensaio de epiderme humana reconstruída e representam as diferentes propriedades intrínsecas dos modelos de ensaio (por exemplo, função de barreira) (ver apêndice 3).
25. Devem utilizar-se em cada ensaio amostras de controlo negativo (CN) e controlo positivo (CP) em paralelo para demonstrar que a viabilidade (utilizando o código NC), a função de barreira e a consequente sensibilidade dos tecidos (com recurso ao controlo positivo) dos tecidos se encontram dentro de um determinado intervalo de aceitabilidade histórico. 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 salina tamponada de fosfato (PBS).

Medição da viabilidade celular

26. Segundo o procedimento de ensaio, é essencial que a medição da viabilidade não seja efetuada imediatamente após a exposição ao produto químico em estudo, mas após um período suficientemente longo de incubação dos tecidos, lavados após o tratamento num meio fresco. Esse período permite tanto a recuperação de efeitos citotóxicos fracos, como a manifestação de efeitos citotóxicos claros. Um período de incubação pós-tratamento de 42 horas foi considerado ótimo durante a otimização do ensaio de dois dos modelos de ensaio baseados na epiderme humana reconstruída que serviram de base ao presente método de ensaio (11) (12) (13) (14) (15).
27. O ensaio MTT é um método quantitativo normalizado que deve ser utilizado para medir a viabilidade celular no âmbito do presente método de ensaio. É compatível com a utilização numa construção de tecidos tridimensional. Coloca-se a amostra dos tecidos numa solução de MTT com uma concentração apropriada (0,3-1 mg/ml, por exemplo), durante 3 horas. O MTT é convertido em azul de formazano pelas células viáveis. O precipitado de azul de formazano é depois extraído dos tecidos com um solvente (por exemplo, isopropanol ou isopropanol acidificado), medindo-se a concentração de formazano por determinação da densidade ótica ao comprimento de onda de 570 nm, utilizando um intervalo de banda de filtro de ± 30 nm, ou por espectrometria HPLC/UPLC (ver ponto 34) (36).
28. As propriedades óticas do produto químico em estudo ou a sua ação química sobre o MTT (os produtos químicos são passíveis, por exemplo, de impedir ou reverter a coloração, bem como de provocá-la), podem interferir no ensaio, conduzindo a uma estimativa falsa de viabilidade. Isto pode suceder se o produto não for completamente removido dos tecidos por lavagem ou se penetrar na epiderme. Se o produto agir diretamente no MTT (reduz o 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 (ver pontos 29 e 33). A descrição pormenorizada do modo de correção da redução direta do MTT e das interferências de agentes corantes está disponível nos PON para os quatro modelos validados incluídos no presente método de ensaio (32) (33) (34) (35).
29. Para identificar os redutores diretos do MTT, os produtos químicos de ensaio devem ser adicionados a soluções de MTT recentemente preparadas. Se a mistura de MTT que contém o produto químico em estudo se tornar azul/púrpura, considera-se que o produto em causa reduz diretamente o MTT, devendo proceder-se a um controlo funcional adicional nos tecidos não viáveis de epiderme humana reconstruída, independentemente do recurso à medição da absorvância padrão ou à espectrofotometria HPLC/UPLC. Este controlo funcional complementar utiliza tecidos mortos, que apenas possuem atividade metabólica residual, mas que absorvem o produto químico em estudo de forma semelhante aos tecidos viáveis. Cada produto químico em estudo que reduz o MTT é aplicado em, pelo menos, dois tecidos replicados mortos, submetidos a todo o processo de ensaio, a fim de obter uma redução não específica do MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Um único controlo do NSMTT é suficiente para cada produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou de ensaios/séries de ensaios independentes realizados. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com os tecidos vivos expostos ao MTT, menos a percentagem de redução não específica do MTT, obtida com os tecidos occisados expostos ao mesmo redutor do MTT, calculado em relação ao controlo negativo concomitante à correção do teste (% NSMTT).
30. Para identificar eventuais interferências de produtos em estudo químicos coloridos ou que adquirem cor quando entram em contacto com a água ou com o isopropanol, e determinar a necessidade de controlos complementares, deve efetuar-se uma análise espectral do produto químico em estudo na água (ambiente durante a exposição) e/ou isopropanol (solução de extração). Se a solução do produto na água e/ou em isopropanol absorver luz na gama 570 ± 30 nm, deve-se proceder a novos controlos de corante ou, em alternativa, recorrer à espectrofotometria HPLC/UPLC, caso em que não são necessários tais controlos (ver pontos 33 e 34). Ao efetuar a medição da absorvância-padrão, aplica-se o produto químico em estudo com cor interferente em, pelo menos, dois tecidos replicados viáveis, que são objeto do procedimento de ensaio, mas são incubados num meio, em vez de o serem numa solução de redução do MTT, durante a fase de incubação do MTT para se obter um controlo da cor não específica (NSC_{vivo}). O controlo NSC_{vivo} deve ser realizado em paralelo com os ensaios do produto químico em estudo; no caso de ensaios múltiplos, é necessário realizar um controlo NSC_{vivo} independente com cada ensaio realizado (em cada série) devido à variabilidade biológica intrínseca dos tecidos vivos. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo interferente menos a percentagem de cor não específica obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em causa e incubados em meio sem MTT, calculada em simultâneo com a correção do ensaio (% NSC_{vivo}).
31. Os produtos químicos em estudo que, comprovadamente, provocam uma redução direta do MTT (ver ponto 29) e interferências de cor (ver ponto 30) requerem um terceiro conjunto de controlos, para além dos controlos NSMTT e NCS_{vivo} descritos nos pontos anteriores, aquando da mensuração da absorvância-padrão (DO). Tal é normalmente o caso dos produtos de cor escura, que interferem com o ensaio do MTT (por exemplo, azuis, púrpura, preto), uma vez que a sua cor intrínseca impede a avaliação da capacidade de reduzirem diretamente o MTT, conforme descrito no ponto 29. Os produtos químicos em estudo podem ligar-se a tecidos vivos e sujeitos a occisão, pelo que o controlo do NSMTT permite não só corrigir uma potencial redução direta do MTT pelo produto químico em estudo, como também uma interferência de cor resultante da ligação do produto

químico aos tecidos sujeitos a occisão. Tal pode levar a uma dupla correção para as interferências de cor, uma vez que o controlo NCS_{vivo} corrige já as interferências de cor que resultam da ligação do produto químico em estudo aos tecidos vivos. Para evitar uma eventual dupla correção para a interferência da cor, é necessário realizar um terceiro controlo da cor não específico dos tecidos mortos (NSC_{mortos}). Neste controlo adicional, aplica-se o produto químico em estudo em, pelo menos, dois replicados dos tecidos mortos submetidos à totalidade do procedimento de ensaio, mas que são incubados com meio durante a etapa de incubação com MTT, em vez da solução de MTT. Basta um único NSC_{morto} controlado por produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou dos ensaios individuais realizados, mas deve ser efetuado em paralelo com o controlo do NSMTT e, sempre que possível, com o mesmo lote de tecidos. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo menos a percentagem de NSMTT menos a percentagem de NSC_{vivo} mais a percentagem não específica obtida com tecidos mortos expostos ao produto químico em causa e incubados em meio sem MTT, calculada em relação à amostra do controlo negativo realizado em simultâneo com a correção do ensaio (% NSC_{morto}).

32. É importante assinalar que a redução não específica do MTT e as interferências de cor não específicas podem aumentar as leituras do extrato de tecido acima da gama de linearidade do espectrofotómetro. Assim, cada laboratório deve determinar a gama de linearidade do respetivo espectrofotómetro com o MTT formazano (n.º CAS 57360-69-7), a partir de uma fonte comercial, antes de se iniciar o ensaio de produtos químicos para ensaio para fins regulamentares. A medição da absorvância-padrão (DO) com espectrofotómetro é adequada para avaliar produtos químicos em estudo que sejam redutores diretos do MTT e com interferência de cor, se as DO dos extratos de tecidos obtidos com o produto químico em estudo, sem qualquer correção, para a redução direta do MTT e/ou para a interferência de cor, se situarem na gama de medição linear do espectrofotómetro, ou se a percentagem de viabilidade não corrigida obtida com o produto químico em estudo for $\leq 50\%$. No entanto, os resultados relativos aos produtos químicos em estudo que produzem percentagens de NSMTT e/ou de NSC_{vivos} com $\geq 50\%$ do controlo negativo devem ser interpretados com precaução, uma vez que este é o valor-limite utilizado para distinguir os produtos químicos classificados dos não classificados (ver ponto 36).
33. No caso de produtos químicos corados que não sejam compatíveis com a medição da absorvância-padrão devido a uma interferência demasiado forte com o ensaio do MTT, pode utilizar-se o procedimento alternativo por espectrofotometria HPLC/UPLC para medir o formazano (ver ponto 34) (36). O sistema HPLC/UPLC permite a separação do formazano do produto químico em estudo antes da sua quantificação (36). Por este motivo, nunca são necessários controlos NCS_{vivos} ou NCS_{mortos} quando se utiliza espectrofotometria HPLC/UPLC, independentemente do produto químico em estudo. Contudo, devem utilizar-se controlos NSMTT se se suspeitar que o produto químico em estudo reduz diretamente o MTT, ou se apresenta uma cor que impede a avaliação da capacidade de reduzir diretamente o MTT (conforme descrito no ponto 29). Caso se utilize a espectrofotometria HPLC/UPLC para medir o formazano, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como percentagem de todos os picos do MTT formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido em paralelo com o controlo negativo. Para os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o MTT, a viabilidade dos tecidos é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo menos a % NSMTT. Por último, é de notar que os redutores diretos do MTT, passíveis de interferirem também com as cores, retidos nos tecidos após o tratamento, reduzem o MTT, de tal forma que provocam lesões oculares (utilizando a medida normal de DO) ou áreas de picos (utilizando espectrofotometria de UPLC/HPLC) de extratos de tecidos testados que se encontram fora do intervalo de linearidade do espectrofotómetro não podem ser avaliados, embora se preveja que isso ocorra apenas em situações muito raras.
34. A espectrofotometria HPLC/UPLC pode também ser utilizada com todos os tipos de produtos químicos em estudo (redutores de MTT e não redutores de MTT) para a medição de MTT formazano (36). Devido à diversidade de sistemas de espectrofotometria HPLC/UPLC, a qualificação do sistema em causa deve ser demonstrada antes da sua utilização para quantificar o MTT formazano de extratos de tecidos, através do cumprimento dos critérios de aceitação de um conjunto de parâmetros de qualificação normalizados, descritos na *U.S. Food and Drug Administration guidance for industry on bio-analytical method validation*. Estes parâmetros-chave e os respetivos critérios de aceitação são apresentados no apêndice 4. Após o cumprimento dos critérios de aceitação definidos no apêndice 4, considera-se o sistema de espectrofotometria HPLC/UPLC qualificado para medir o MTT formazano nas condições experimentais descritas no presente método de ensaio.

Crítérios de aceitabilidade

35. Em cada método que utilize lotes válidos do modelo de epiderme humana reconstruída (ver o ponto 23), a densidade ótica dos tecidos tratados com o produto químico de controlo negativo deve refletir a qualidade dos 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. Da mesma forma, os tecidos tratados com o CP, ou seja, a solução aquosa a 5 % de SDS, devem ter a capacidade de reagir a um produto químico irritante nas condições do método de ensaio (ver apêndice 3 para mais informações e PON dos quatro modelos de ensaio incluídos nesta *Test Guideline* (32) (33) (34) (35). As medidas conexas e adequadas de variabilidade entre tecidos replicados, ou seja, os desvios-padrão (DP) devem estar em conformidade com os limites de aceitação estabelecidos para o modelo de ensaio utilizado (ver apêndice 3).

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

36. Os valores de densidade ótica obtidos para cada produto químico em estudo podem ser utilizados para calcular a percentagem de viabilidade normalizada em relação ao controlo negativo, que é fixada em 100 %. Caso se utilize a espectrofotometria HPLC/UPLC, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como percentagem de todos os picos do MTT formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido em paralelo com o controlo negativo. 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 (ver PON dos modelos de ensaio para informação). Indicam-se a seguir os valores-limite de diferenciação para a previsão de efeitos irritantes:
- O produto químico em estudo é identificado em conformidade com os requisitos de classificação e rotulagem dos sistemas GHS da ONU/CRE (categoria 2 ou categoria 1) se a percentagem média de viabilidade dos tecidos após exposição e incubação pós-tratamento for inferior ou igual (\leq) a 50 %. Dado que os modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída abrangidos por este método não permitem diferenciar as categorias 1 e 2 do sistema GHS da ONU, é necessário obter mais dados sobre corrosão cutânea para decidir a classificação final [ver também o documento de orientação da OCDE sobre a IATA (3)]. Caso o produto químico em estudo seja considerado não corrosivo (por exemplo, com base nos métodos de ensaio M.40, B.40.A ou B.65) e a viabilidade dos tecidos após exposição e incubação pós-tratamento for inferior ou igual a 50 %, considera-se que é irritante para a pele, em conformidade com a categoria 2 do sistema GHS da ONU.
 - Consoante o quadro regulamentar dos países membros, o produto químico em estudo pode ser considerado não irritante para a pele, em conformidade com os sistemas GHS da ONU/CRE, ou classificado de «nenhuma categoria», se a viabilidade dos tecidos depois da exposição e da incubação subsequente ao tratamento for superior a 50 %.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

37. Para cada série de ensaios, devem apresentar-se 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 \pm desvio-padrão. Devem referir-se ainda, para cada produto químico em estudo, as interações observadas com o MTT e se é corado.

Relatório de ensaio

38. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo

- Substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;
- Substância multicomponentes, UVCB e mistura: na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes;
- Aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- Proveniência, número do lote, se disponíveis;
- Tratamento dos produtos químicos em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo), antes do ensaio;
- Estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas;
- Condições de armazenagem;

Modelo de epiderme humana reconstruída, protocolo utilizado (e fundamentação do mesmo, se pertinente).

Condições de realização do ensaio

- Modelo de epiderme humana reconstruída utilizado (incluindo número do lote);
- Informações sobre a calibração do dispositivo de medição (por exemplo, espectrofotómetro); comprimento de onda e gama de comprimentos de onda (se pertinente) utilizados para a quantificação do MTT formazano; descrição do método utilizado para quantificar o MTT formazano;
- Descrição da qualificação do sistema de sistema de espectrofotometria HPLC/UPLC, se pertinente; 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) controlos de qualidade (CQ) do modelo;
- Referência a dados anteriormente publicados sobre o modelo; tal deve incluir, sem carácter limitativo, a aceitabilidade dos dados de controlo da qualidade com referência a dados históricos de lotes.
- Demonstração da competência na execução do método de ensaio antes da sua utilização por rotina através do ensaio das substâncias de referência.

Procedimento de ensaio

- Pormenores sobre o procedimento de ensaio utilizado (incluindo procedimentos de lavagem utilizados após o período de exposição); doses do produto químico em estudo e dos produtos químicos de controlo utilizados;
- Duração e temperatura da exposição e do período de incubação após a exposição;
- Indicação dos controlos utilizados nos reductores diretos do MTT e/ou dos produtos químicos em estudo que apresentem coloração, se pertinente;
- Número de tecidos replicados utilizados para cada produto químico em estudo e controlos (CP, controlo negativo e NSMTT, NSC_{vivos} e NSC_{mortos}, se pertinente);
- Descrição do modelo de critérios/previsão de decisão aplicado com base no modelo de epiderme humana reconstruída utilizado;
- Descrição de quaisquer modificações introduzidas no procedimento de ensaio (incluindo procedimentos de lavagem).

Crítérios de aceitação de série de ensaios e de ensaios

- Valores médios dos controlos positivos e negativos e intervalos de aceitação com base em dados históricos; variabilidade aceitável entre os tecidos replicados para os controlos positivos e negativos;
- Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados para o produto químico em estudo;

Resultados

- Quadro com os dados correspondentes a cada produto químico em estudo e a cada replicado, incluindo as medições de densidade ótica ou zonas de pico do MTT formazano, percentagem de viabilidade dos tecidos, percentagem média de viabilidade dos tecidos e desvio-padrão;
- Se for caso disso, resultados dos controlos utilizados nos produtos químicos em estudo de redução direta do MTT e/ou do ensaio de coloração dos produtos químicos em estudo, incluindo as DO ou a zona de pico do MTT formazano, percentagens de NSMTT, de NSC_{vivos} e de NSC_{mortos}, DP e a percentagem final correta de viabilidade dos tecidos;
- Resultados obtidos com o(s) produto(s) químico(s) em estudo e os produtos químicos de controlo à luz dos critérios de aceitação de ensaios e séries de ensaios definidos;
- Descrição de outros efeitos eventualmente observados;
- Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Nações Unidas (ONU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) EURL-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”, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf
- (3) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»
- (5) Chapter B.40 of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER).
- (6) Chapter B.40bis of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) test method.
- (7) Capítulo B.65 deste anexo: «Método de ensaio da membrana de estanquidade *in vitro*»
- (8) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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 .
- (18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and 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-Tessonnaud, E. and 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, *ALTEX*, 14, 351-358.
- (20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf
- (21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. N.B.: *Trata-se das normas de desempenho originais utilizadas para validação dos dois métodos de ensaio. Estes normas de desempenho já não devem ser utilizadas, uma vez que já está disponível uma versão atualizada* (8).
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

- (23) OCDE (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327-334
- (25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122
- (26) OCDE (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (27) OCDE (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
- (29) Welss, T., Basketter, D.A. and 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.
- (30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403).
- (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals
- (33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
- (34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- (35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscrito em preparação.
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponível em: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

- (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RHE). *Nota: Esta é a versão atual das normas de desempenho do ECVAMS, que foram atualizadas em 2009 tendo em vista a implementação do GHS da ONU. Estas normas não devem ser utilizadas, dado que se encontra disponível uma versão atualizada (8) relacionada com a presente TG.*
- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (41) EC (2001). Directiva 2001/59/CE da Comissão, de 6 de agosto de 2001, que adapta ao progresso técnico pela vigésima oitava vez a Directiva 67/548/CEE do Conselho, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas, Jornal Oficial da União Europeia L 225 de 21.8.2001, p. 1-333.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

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).

Concordância: Mede o desempenho do método de ensaio no caso dos modelos cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e constitui um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «exatidão» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de produtos químicos testados que são corretamente classificados como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência do produto químico em estudo positivos no tipo de produto químico em estudo (9).

CP: Controlo positivo – replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que, comprovadamente, induz reação positiva. Para que se possa determinar a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

Dose infinita: Quantidade de produto químico em estudo aplicada à epiderme que excede a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície da epiderme.

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).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos em estudo negativos/inativos que são corretamente classificados 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).

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).

ET₅₀: 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 IC₅₀.

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

HPLC: Cromatografia líquida de alta resolução.

IATA: Abordagem integrada de ensaio e avaliação.

IC₅₀: Pode estimar-se através da determinação da concentração à qual um produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (IC₅₀) após um tempo de exposição fixo, ver também ET₅₀.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (azul de tiazolilo).

NSC_{mortos}: Cor não específica em tecidos mortos.

NSC_{vivos}: Cor não específica em tecidos vivos.

NSMTT: Redução não específica do MTT.

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. Incluem: (i) componentes essenciais do método de ensaio; (ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (iii) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (9).

Produto químico: Uma substância ou mistura.

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

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos em estudo positivos/ativos que são corretamente classificados 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).

Série de ensaios: Uma série de ensaios consiste no ensaio de um ou mais produtos químicos em estudo em simultâneo com um controlo negativo e um controlo positivo.

Sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, da Organização das Nações Unidas (ONU): Sistema 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 correspondentes elementos de comunicação, 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).

Substância: Um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

UPLC: Cromatografia líquida de muito alta resolução.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

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-dimetiltiazol-2-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.

Apêndice 2

MODELOS DE ENSAIO INCLUÍDOS NESTE MÉTODO DE ENSAIO

N.º	Nome do modelo de ensaio	Tipo de estudo de validação	Referências
1	EpiSkin™	Estudo prospetivo de validação (2003-2007). Os componentes deste modelo foram utilizados para definir os componentes essenciais do método de ensaio das normas de desempenho do ECVAM original e atualizado (39) (40) (21) (*). Além disso, os dados do método relativos à identificação de substâncias classificadas e não classificadas constituíram a base principal da definição dos valores de especificidade e sensibilidade das normas de desempenho originais (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (original): Inicialmente, o modelo de ensaio foi submetido a validação prospetiva completa, juntamente com o n.º 1, desde 2003-2007. Os componentes deste modelo foram utilizados para definir os componentes essenciais do método de ensaio das normas de desempenho do ECVAM original e atualizado (39) (40) (21) (*). EpiDerm™ SIT (EPI-200): Em 2008 (*), as normas de desempenho do ECVAM foram utilizadas para validar uma alteração à EpiDerm™ original.	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Estudo de validação com base nas normas de desempenho ECVAM originais (21) em 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Estudo de validação (2011-2012) baseado nas normas de desempenho (PS) da <i>Test Guideline</i> 439 da OCDE (8), que se baseiam nas PS (*) do ECVSM (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) e PS deste <i>Test Guideline</i> (8) (*)

(*) As normas de desempenho originais do CEVMA (21) foram desenvolvidas em 2007 após a conclusão do estudo de validação prospetivo (16), que avaliou o desempenho dos modelos de ensaio n.º 1 e 2, por referência ao sistema de classificação descrito na 28.ª alteração à Diretiva Substâncias Perigosas da UE (41). Em 2008, foram introduzidos o GHS da ONU (1) e o CRE da UE, que alteraram claramente o valor-limite para a distinção entre substâncias não classificadas e substâncias classificadas de uma pontuação *in vivo* de 2,0 para 2,3. Para se adaptarem a esta nova exigência normativa, os valores da exatidão e a lista de produtos químicos de referência das PS da ECVAM foram atualizados em 2009 (2) (39) (40). Como as PS originais, também as PS atualizadas se basearam, em grande medida, em dados do sobre os produtos químicos de referência do modelo n.º 3. Em 2010, as PS do ECVAM atualizadas foram utilizadas para a elaboração das normas de desempenho relacionadas com a presente *Test Guideline* (8). Para efeitos do presente método de ensaio, o EpiSkin™ é considerado o MRV, por ter sido utilizado para desenvolver todos os critérios das PS. Do documento explicativo ECVAM/BfR, correspondente à *Test Guideline* 439 da OCDE (23), constam informações pormenorizadas sobre os estudos de validação, uma compilação dos dados gerados e as necessárias adaptações das normas de desempenho em consequência da aplicação do sistema GHS da ONU/CRE.

SIT: Ensaio de irritação cutânea

RHE: Epiderme humana reconstruída

Apêndice 3

PARÂMETROS DE PROTOCOLO ESPECÍFICOS A CADA UM DOS MODELOS ABRANGIDOS PELO PRESENTE MÉTODO DE ENSAIO

Os modelos de epiderme humana reconstruída apresentam protocolos muito semelhantes; nomeadamente, todos utilizam um período de pós-incubação de 42 horas (32) (33) (34) (35). As principais diferenças dizem respeito a três parâmetros relacionados com as diferentes funções de barreira dos modelos de ensaio, enumerados aqui: A) Tempo e volume de pré-incubação, B) Aplicação de produtos químicos em estudo e C) volume pós-incubação.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic >RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
--	---------------	------------------------	-----------------	-------------------------

A) Pré-incubação

Tempo de incubação	18-24 horas	18-24 horas	< 2 horas	15-30 horas
Volume médio	2 ml	0,9 ml	0,3 ou 1 ml	0,5 ml

B) Aplicação do produto químico em estudo

Para líquidos	10 µl (26 µl/cm ²)	30µl (47 µl/cm ²)	16µl (32 µl/cm ²)	25µl (83 µl/cm ²)
Para sólidos	10 mg (26 mg/cm ² + DW (5 µl))	25 mg (39 mg/cm ²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm ²) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm ²) + DW (25 µl)
Utilização de malha de nylon	Não utilizada	Se necessário	Aplicada	Não utilizada
Tempo total de aplicação	15 minutos	60 minutos	42 minutos	15 minutos
Temperatura de aplicação	temperatura ambiente	a) à temperatura ambiente durante 25 minutos b) a 37 °C durante 35 minutos	temperatura ambiente	temperatura ambiente

C) Volume pós-incubação

Volume médio	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
--------------	------	------------	------	------

D) Variabilidade máxima aceitável

Desvio-padrão entre os tecidos replicados	DP ≤ 18	DP ≤ 18	DP ≤ 18	DP ≤ 18
-------------------------------------------	---------	---------	---------	---------

TA: Temperatura ambiente

AD: Água destilada

DPBS: Solução-tampão salina de fosfatos Dulbecco

Apêndice 4

PARÂMETROS FUNDAMENTAIS E CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A QUALIFICAÇÃO DE UM SISTEMA DE ESPETROFOTOMETRIA HPLC/UPLC PARA A MEDIÇÃO DO MTT FORMAZANO EM EPIDERMES HUMANAS RECONSTRUÍDAS

Parâmetro	Protocolo derivado do documento de orientação da FDA (36) (37)	Crítérios de aceitação
Seletividade	Análise do isopropanol, branco vivo (extração de isopropanol de tecidos vivos de epiderme humana reconstruída sem qualquer tratamento), branco morto (extração de isopropanol de tecidos mortos de epiderme humana reconstruída sem qualquer tratamento)	$Area_{interferência} \leq 20 \% \text{ of } Area_{LLOQ}^{(1)}$
Precisão	Controlos de qualidade (MTT formazano a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) em isopropanol (n = 5)	$CV \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ para o LLOQ}$
Exatidão	Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	$\% \text{ Dev } \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ para LLOQ}$
Efeito matriz	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 5)	$85 \% \leq \text{Efeitos matriz } \% \leq 115 \%$
Passagem	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ ⁽²⁾	$Area_{interference} \leq 20 \% \text{ of } Area_{LLOQ}$
Reprodutibilidade (intradia)	Três curvas de calibração independentes (com base em seis diluições consecutivas de 1/3 de MTT formazano em isopropanol, com início em ULOQ, isto é, 200 µg/ml); Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curvas de calibração: $\% \text{ Dev } \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ para LLOQ}$
Reprodutibilidade (intradia)	Dia 1: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 2: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 3: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3)	Controlos de qualidade: $\% \text{ Dev } \leq 15 \% \text{ e } CV \leq 15 \%$
Estabilidade a curto prazo do MTT formazano em extratos de tecidos de epiderme humana reconstruída	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisado no dia da preparação e após 24 horas de armazenagem à temperatura ambiente	$\% \text{ Dev } \leq 15 \%$
Estabilidade a longo prazo do MTT formazano em extratos de tecidos de epiderme humana reconstruída, se necessário	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisado no dia da preparação e após vários dias de armazenagem a uma temperatura especificada (p. ex., 4 °C, — 20 °C, — 80 °C)	$\% \text{ Dev } \leq 15 \%$

(1) LLOQ: Limite inferior de quantificação, definido de forma a abranger 1-2 % de viabilidade dos tecidos, ou seja, 0,8 µg/ml.

(2) ULOQ: Limite superior de quantificação, definido para ser duas vezes superior à mais elevada concentração de MTT formazano em extratos de isopropanol de controlos negativos, isto é, 200 µg/ml.

(8) Na parte B, são aditados os seguintes capítulos:

«B.63 ENSAIO DE TOXICIDADE PARA A REPRODUÇÃO/O DESENVOLVIMENTO

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 421 (2016) da OCDE. As diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos são revistas periodicamente à luz do progresso científico. A diretriz n.º 421 para os testes de rastreio inicial foi adotada em 1995, com base num protocolo «ensaio preliminar de despistagem da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento», debatido em duas reuniões de peritos, realizadas em Londres, em 1990, (1) e em Tóquio, em 1992 (2).
2. O presente método de ensaio foi atualizado com parâmetros relativos a perturbadores do sistema endócrino, na sequência da atividade da OCDE altamente prioritária, iniciada em 1998, de revisão das diretrizes de ensaio existentes e elaboração de novas orientações para a análise e o ensaio de possíveis perturbadores do sistema endócrino (3). Neste contexto, a TG 407 da OCDE (estudo de toxicidade pela repetição de uma dose oral durante 28 dias em roedores – capítulo B.7 do presente anexo) foi enriquecida em 2008 com parâmetros adequados para detetar a atividade endócrina de produtos químicos em estudo. O objetivo da atualização da *Test Guideline* 421 era incluir alguns parâmetros importantes no rastreio dos perturbadores do sistema endócrino nas *Test Guideline* cujos períodos de exposição abrangem alguns dos períodos sensíveis do desenvolvimento (período pré-natal e primeira fase do período pós-natal).
3. Os restantes parâmetros aplicáveis aos perturbadores do sistema endócrino selecionados, igualmente incluídos na *Test Guideline* 443 (estudo alargado da toxicidade reprodutiva numa geração – capítulo B.56 deste anexo) foram incluídos na *Test Guideline* 421 com base num estudo de viabilidade sobre as questões científicas e técnicas, bem como em eventuais adaptações da conceção do ensaio necessárias à sua inclusão (4).
4. O presente método de ensaio destina-se a gerar informações limitadas sobre os efeitos de um produto químico em estudo no desempenho reprodutor masculino e feminino, como a função gonadal, o comportamento de acasalamento, a fecundação e o desenvolvimento do feto e o parto. Não constitui uma alternativa aos métodos de ensaio B.31, B.34, B.35 ou B.56, nem os substitui.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. O presente método de ensaio pode ser utilizado para fornecer informações preliminares sobre possíveis efeitos na reprodução e/ou no desenvolvimento, quer numa fase inicial da avaliação das propriedades toxicológicas dos produtos químicos, quer sobre produtos químicos que suscitem preocupação. Pode também ser utilizado no âmbito de um conjunto de ensaios preliminares com produtos químicos existentes sobre os quais se disponha de pouca ou nenhuma informação toxicológica, como estudo exploratório de determinação da gama de dosagens para estudos mais exaustivos sobre a reprodução/o desenvolvimento, ou sempre que for considerado importante. Na realização do estudo, deverão seguir-se os princípios de orientação e as considerações descritas no documento de orientação 19 da OCDE quanto ao reconhecimento, avaliação e utilização dos sinais clínicos como parâmetros extrapoláveis aos seres humanos para experiências com animais utilizados em avaliações de segurança (5).
6. O presente método de ensaio não fornece informações completas sobre todos os aspetos da reprodução e do desenvolvimento. Faculta apenas, nomeadamente, meios limitados de deteção de manifestações pós-natais de exposição pré-natal ou de efeitos que possam ser induzidos durante a exposição pós-natal. Devido, entre outros motivos, ao número relativamente reduzido de animais dos grupos de dosagem, à seletividade dos parâmetros e à curta duração do estudo, o método não fornece dados que apoiem a declaração definitiva de inexistência de efeitos. Além disso, na ausência de dados de outros ensaios de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento, os resultados positivos são úteis para a avaliação preliminar dos perigos e contribuem para informar as decisões relativas à necessidade e à oportunidade de ensaios adicionais.
7. Os resultados correspondentes aos parâmetros relacionados com o sistema endócrino devem interpretar-se com base no documento *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* (6), elaborado pela OCDE, que estabelece um quadro conceptual para o ensaio e a avaliação de produtos químicos perturbadores do sistema endócrino. Nesse quadro, o método correspondente à *Test Guideline* 421 da OCDE melhorada consta do nível 4, como ensaio *in vivo* que fornece dados sobre efeitos nocivos nos parâmetros pertinentes do sistema endócrino. Contudo, um sinal do sistema endócrino não pode, por si só, ser considerado prova suficiente de que o produto em causa é perturbador do sistema endócrino.
8. O presente método prevê a administração por via oral do produto químico em estudo. Poderá ser necessário introduzir alterações se forem utilizadas outras vias de exposição.

9. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.
10. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. O produto químico em estudo é administrado, em doses escalonadas, a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos devem ser tratados durante, pelo menos, quatro semanas – até ao dia anterior ao da eutanásia, inclusive –, o que abrange um mínimo de duas semanas antes do acasalamento, o período de acasalamento e aproximadamente duas semanas após este. Tendo em conta o período limitado de dosagem antes do acasalamento dos machos, a fertilidade não pode constituir um indicador particularmente sensível da toxicidade testicular. Por conseguinte, é essencial um exame histológico pormenorizado dos testículos. A combinação de um período de dosagem pré-acasalamento de duas semanas e de observações subsequentes de acasalamento/fertilidade com um período global de dosagem de, pelo menos, quatro semanas, seguido de histopatologia pormenorizada das gónadas do macho, é considerada suficiente para permitir a deteção da maioria dos efeitos na fertilidade masculina e na espermatogénese.
12. As fêmeas devem ser tratadas ao longo de todo o estudo – ou seja, duas semanas antes do acasalamento –, com o objetivo de abranger, pelo menos, dois ciclos éstricos completos, o período variável até à fecundação, a duração da gravidez e, pelo menos, treze dias após o parto, até ao dia anterior ao da eutanásia, inclusive.
13. A duração do estudo após a aclimação, com uma avaliação do ciclo éstrico antes do início do tratamento, depende do desempenho das fêmeas, e é de cerca de 63 dias [pelo menos 14 dias antes do acasalamento, até 14 dias de acasalamento, 22 dias de gestação, 13 dias de aleitamento].
14. No período de administração, deve verificar-se atentamente, todos os dias, se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Os animais que morrem ou são eutanasiados durante o ensaio são autopsiados; no final do ensaio, são eutanasiados e autopsiados os animais sobreviventes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção de espécies animais

15. O presente método de ensaio foi concebido para ratazanas. Se os parâmetros que nele se especificam forem estudados noutra espécie de roedor, essa opção deve ser justificada pormenorizadamente. No programa de validação internacional para a deteção de perturbadores do sistema endócrino com base na TG 407 da OECD (correspondente ao capítulo B.7 do presente anexo), as ratazanas foram a única espécie utilizada. Deve evitar-se o recurso a estirpes de fecundidade baixa ou com uma incidência elevada de deficiências de desenvolvimento. Devem utilizar-se animais virgens saudáveis, não sujeitos a experiências anteriores, e especificar-se a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder 20 % do peso médio dos animais de cada sexo. Nos casos em que for realizado como estudo preliminar de um estudo a longo prazo ou de geração, é preferível utilizar animais da mesma estirpe e proveniência em ambos os estudos.

Condições de alojamento e de alimentação

16. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 °C (± 3). A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. A escolha da dieta pode depender da necessidade de garantir uma mistura adequada do produto químico em estudo, quando administrado por essa via.

17. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo. Podem ser alojados individualmente, se tal se justificar do ponto de vista científico. Em caso de alojamento coletivo, cada gaiola não deve alojar mais de cinco animais. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. As fêmeas prenhes devem ser colocadas em gaiolas individuais e dispor de materiais de nidificação. As fêmeas em lactação devem ser colocadas em gaiolas individuais com as crias.
18. Deve efetuar-se com regularidade uma pesquisa de contaminantes nos alimentos fornecidos e conservar-se uma amostra da dieta até o relatório estar concluído.

Preparação dos animais

19. Distribuem-se aleatoriamente animais adultos, jovens e saudáveis pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias antes do início do estudo.

Preparação das doses

20. Recomenda-se que a consulta do PON pertinente aquando da implementação e utilização de um desses modelos no laboratório. Se for selecionada a via oral, o produto químico em estudo é geralmente administrado por gavagem; no entanto, os produtos químicos em estudo podem ser administrados através dos alimentos ou da água de beber.
21. Quando necessário, o produto químico em estudo pode ser dissolvido ou suspenso num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se, como primeira opção, uma solução ou suspensão aquosa; caso isso não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, pode recorrer-se a uma solução noutra veículo. Se este não for aquoso, devem conhecer-se as suas características tóxicas. Importa determinar a estabilidade e a homogeneidade do produto químico em estudo no veículo.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

22. Recomenda-se que cada grupo seja iniciado com, pelo menos, 10 machos e 12-13 fêmeas. As fêmeas serão avaliadas para pré-exposição do ciclo éstrico; os animais que não apresentem ciclos típicos de 4-5 dias não são incluídos no estudo. Assim, é recomendável utilizar um número mais elevado de fêmeas, a fim de assegurar a presença de 10 fêmeas reprodutoras em cada grupo. Exceto no caso de efeitos tóxicos marcados, prevê-se que o número de fêmeas prenhes por grupo seja, no mínimo, igual a 8, que, normalmente, é o número mínimo aceitável de fêmeas prenhes por grupo. O objetivo é produzir gravidezes e crias em número suficiente para assegurar uma avaliação significativa do potencial do produto químico em estudo para afetar a fertilidade, a gravidez, o comportamento materno e de aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F₁, desde a concepção até ao dia 13 pós-parto.

Dosagem

23. De modo geral, devem utilizar-se, no mínimo, três lotes de ensaio e um lote de controlo. As doses podem basear-se em informações dos ensaios de toxicidade aguda ou em resultados de estudos de dose repetida. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais dos grupos de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado.
24. Na seleção das doses devem ter-se em conta os dados eventualmente disponíveis em matéria de toxicidade e toxicocinética. Deve também ter-se em conta o facto de poder haver diferenças de sensibilidade entre animais prenhes e não prenhes. Importa escolher como dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, mas não cause mortalidade nem sofrimento intenso. Deve selecionar-se uma sequência descendente de doses que permita detetar qualquer resposta relacionada com estas e determinar o nível sem efeito nocivo observável (NSEAO) à dose mais baixa. A inclusão de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes (fatores superiores a 10) entre as dosagens.

25. Caso se observem sinais de toxicidade generalizada (por exemplo, redução do peso corporal, efeitos ao nível hepático, cardíaco, pulmonar ou renal, etc.) ou outras alterações que possam não ser reações tóxicas (por exemplo, diminuição da quantidade de alimentos ingerida, dilatação hepática, etc.), deverá interpretar-se com cautela qualquer efeito ao nível dos parâmetros endócrinos.

Ensaio no limite

26. Se um estudo oral com uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de peso corporal/dia – ou, no caso da administração por via alimentar ou pela água de beber, de uma percentagem equivalente na alimentação ou na água de beber –, utilizando os procedimentos descritos para o estudo, não produzir efeitos tóxicos observáveis e, com base nos dados relativos a substâncias estruturalmente afins, não for de esperar efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efetuar um estudo completo com várias doses. O ensaio-limite é sempre válido, exceto nos casos em que se preveja exposição humana e em que seja necessário testar um nível de dose oral mais elevado. Quando se recorre a outras formas de administração, como a inalação ou a aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas do produto químico de ensaio são muitas vezes indicativas e limitativas do nível máximo de exposição praticável.

Administração das doses

27. Os animais são tratados diariamente com o produto químico em estudo durante 7 dias por semana. A administração forçada por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se numa dose única, utilizando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido administrado em cada operação depende das dimensões do animal, não devendo exceder 1 ml/100 g de massa corporal, exceto no caso de soluções aquosas, em que podem administrar-se 2 ml/100 g de massa corporal. Exceto para produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente produzem efeitos exacerbados em concentrações superiores, a variabilidade no volume de ensaio deve ser minimizada, ajustando a concentração de modo a garantir um volume constante em todos os níveis de dosagem.
28. No caso de produtos químicos em estudo administrados através da alimentação ou da água de beber, é importante assegurar que as quantidades do produto não interferem com a nutrição normal ou com a composição da água. Se o produto químico em estudo for administrado na alimentação, pode optar-se por concentrações constantes nesta (da ordem das ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal de cada animal. Caso o produto químico em estudo seja administrado por gavagem, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ajustar-se, pelo menos, uma vez por semana, a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal.

Calendário da experiência

29. O tratamento de ambos os sexos deve ter início 2 semanas antes do acasalamento, depois de os animais serem aclimatados durante pelo menos 5 dias e de as fêmeas serem sujeitas a exames de deteção de ciclos éstricos normais (num período de 2 semanas anterior ao tratamento). O estudo deve ser programado de forma a que a avaliação do ciclo éstrico comece pouco depois de os animais terem atingido a plena maturidade sexual, o que pode variar ligeiramente nas diferentes linhagens de ratazanas em laboratórios diferentes, sendo, por exemplo, às 10 semanas nas ratazanas Sprague Dawley e cerca das 12 semanas nas ratazanas Wistar. As mães com crias devem ser eutanasiadas no dia 13 após o parto, ou pouco depois. O dia de nascimento (ou seja, quando o parto é concluído) é definido como o dia 0 após o parto. As fêmeas que não apresentem qualquer indício de copulação são mortas 24 a 26 dias após o último dia do período de acasalamento. O nível de dosagem é mantido em ambos os sexos durante o período de acasalamento. Os machos devem continuar a ser tratados após o período de acasalamento, pelo menos até ter decorrido o período total mínimo de dosagem, de 28 dias. Em seguida, são eutanasiados ou, em alternativa, são mantidos e continuam a ser tratados, para um eventual segundo acasalamento, se isso for considerado adequado.
30. As fêmeas prenhes devem continuar a ser tratadas durante a gravidez e, pelo menos, até ao dia 13 após o parto ou ao dia anterior ao abate. No caso de o produto químico em estudo ser administrado por inalação ou por via cutânea, o tratamento deve continuar a ser administrado pelo menos até ao dia 19 de gestação, inclusive, e retomado o mais rapidamente possível, o mais tardar no dia 4 após o parto.
31. O apêndice 2 apresenta um diagrama do calendário da experiência.

Processo de acasalamento

32. Normalmente, devem ser utilizados neste estudo acasalamentos de 1:1 (um macho e uma fêmea). Pode haver exceções em caso de morte ocasional de machos. A fêmea deve permanecer com o mesmo macho até se observarem indícios de copulação ou terem decorrido duas semanas. Deverão examinar-se as fêmeas todas as manhãs, para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gravidez é definido como o dia em que houver provas de acasalamento (deteção de rolhão vaginal ou esperma). Se a tentativa de acasalamento for mal sucedida, poderá tentar-se um novo acasalamento das fêmeas com machos do mesmo grupo comprovadamente aptos a procriar.

Número de animais por ninhada

33. No dia 4 após o parto, o número de animais de cada ninhada pode ser ajustado eliminando as crias excessivas por seleção aleatória, a fim de se obter, na medida do possível, quatro ou cinco crias por sexo e por ninhada, consoante o tamanho normal das ninhadas das estirpes de ratazanas utilizadas. Devem ser colher-se amostras de sangue de duas das crias excedentárias, que serão agrupadas e utilizadas para a determinação dos níveis do soro T4. Não é adequada a eliminação seletiva das crias, por exemplo, com base no peso corporal ou na distância anogenital (DAG). Sempre que o número de crias do sexo masculino ou feminino impeça a obtenção de quatro ou cinco animais de cada sexo por ninhada, é admissível um ajustamento parcial (por exemplo, seis machos e quatro fêmeas). Não devem ser eliminadas crias se as ninhadas ficarem aquém da meta de abate (8 ou 10 crias/ninhada). Se existir uma única cria além da meta de abate, apenas uma cria deve ser eliminada e utilizada para a colheita de sangue para possíveis avaliações séricas de T4.
34. Se o tamanho da ninhada não for ajustado, eutanasiem-se duas crias por ninhada no dia 4 após o nascimento e são colhidas amostras de sangue para medição das concentrações de hormonas da tiroide. Se possível, essas duas crias de cada ninhada devem ser fêmeas, a fim de reservar as crias do sexo masculino para as avaliações de retenção de mamilo, exceto se essas crias não deixarem outras fêmeas para avaliação no termo da experiência. Não devem ser eliminadas crias se a ninhada ficar com menos de 8 ou 10 crias/ninhada (em função do tamanho normal das ninhadas das estirpes de ratazanas utilizadas). Se existir apenas uma cria além do tamanho normal das ninhadas, apenas uma cria deve ser eliminada e utilizada para a colheita de sangue destinada a possíveis avaliações séricas de T4.

Observações *in vivo*

Observações clínicas

35. Ao longo de todo o período de ensaio, devem efetuar-se exames clínicos gerais, pelo menos, uma vez por dia, frequência que pode aumentar em caso de observação de sinais de toxicidade. Devem ser feitas, de preferência, à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em conta o período de pico dos efeitos previstos após a administração da dose. Devem registar-se modificações de comportamento significativas, sinais de parto difícil ou prolongado, bem como qualquer sinal de toxicidade, incluindo a mortalidade. Estes registos devem indicar o momento da ocorrência, o grau e a duração dos sinais de toxicidade.

Peso corporal e consumo de alimentos/água

36. Os machos e as fêmeas devem ser pesados no primeiro dia de tratamento, pelo menos uma vez por semana a partir de então e no final. Durante a gestação, as fêmeas devem ser pesadas nos dias 0, 7, 14 e 20 e nas 24 horas seguintes ao parto (dia 0 ou 1 pós-parto) e, pelo menos, nos dias 4 e 13 pós-parto. As observações devem ser registadas individualmente para cada animal adulto.
37. Durante o pré-acasalamento, a gestação e o aleitamento, o consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. A medição do consumo de alimentos durante o acasalamento é facultativa. Se o produto químico em estudo for administrado através da água para beber, o consumo de água durante estes períodos também deve ser determinado.

Ciclos éstricos

38. Os ciclos éstricos devem ser monitorizados antes do início do tratamento, de forma a selecionar para o estudo fêmeas com um ciclo regular (ver ponto 22). Os esfregaços vaginais também devem ser monitorizados diariamente desde o início do período de tratamento até haver indicações de acasalamento. Se houver preocupações quanto a efeitos agudos causados pelo stress que possam alterar os ciclos éstricos no início do tratamento, os laboratórios podem expor os animais durante 2 semanas, e em seguida colher esfregaço vaginal diariamente, a fim de monitorizar o ciclo éstrico durante, pelo menos, duas semanas no período de pré-acasalamento e igualmente durante o período de acasalamento, até que haja provas de copulação. Aquando da colheita de células vaginais/cervicais, deve ter-se o cuidado de evitar perturbar a mucosa, o que pode induzir uma pseudo-gravidez (7) (8).

Parâmetros relativos à descendência

39. A duração da gestação deve ser registada e calculada a partir do dia 0. Cada ninhada deve ser examinada o mais rapidamente possível após o nascimento, a fim de determinar o número e o sexo das crias, os nados-mortos, os nados-vivos e as crias que são significativamente menores do que as crias de controlo correspondentes, bem como a presença de anomalias relevantes.

40. As crias vivas devem ser contadas e determinado o sexo de cada uma; as ninhadas devem ser pesadas nas 24 horas seguintes ao parto (dia 0 ou 1 após o parto) e, pelo menos, nos dias 4 e 13 pós-parto. Para além das observações descritas no ponto 35, deve registar-se qualquer comportamento anormal das crias.
41. A DAG de cada cria deve ser medida no mesmo dia pós-natal, entre o dia 0 e o dia 4. O peso corporal da cria deve ser medido no dia em que a DAG for determinada; as DAG devem ser normalizadas de acordo com uma medida do tamanho da cria, preferencialmente a raiz cúbica do peso corporal (9). O número de mamilos/aréolas em crias do sexo masculino deve ser contado no dia 12 ou 13 após o nascimento, como recomenda a GD 151 (10) da OCDE.

Bioquímica clínica

42. As amostras de sangue são colhidas num ponto específico, de acordo com o seguinte calendário:
 - pelo menos, de duas crias por ninhada, no dia 4 após o nascimento, se o número de crias o permitir (ver pontos 33 a 34)
 - de todas as mães e, pelo menos, de duas crias por ninhada, no final (dia 13), e
 - de todos os machos adultos, no final.

Todas as amostras de sangue são armazenadas em condições adequadas. As amostras de sangue do dia 13 das crias e dos machos adultos são analisadas para determinação dos níveis séricos de hormonas da tiroide (T4). Se necessário, procede-se a uma avaliação mais aprofundada de T4 nas amostras de sangue das mães e do dia 4 das crias. Em alternativa, podem ser medidas outras hormonas, se necessário. O sangue das crias pode ser agrupado por ninhada para a realização de análises das hormonas da tiroide. As hormonas da tiroide (T4 e TSH) devem ser, de preferência, medidas como «totais».

43. Os fatores a seguir indicados podem afetar a variabilidade dos resultados das análises hormonais e as concentrações absolutas nelas determinadas:
 - momento da eutanásia, devido à variação das concentrações hormonais ao longo do dia,
 - método utilizado para eutanasiar os animais sem lhes causar tensões desnecessárias, que poderiam afetar as concentrações hormonais,
 - diferenças ao nível das curvas de calibração dos conjuntos para as determinações hormonais.
44. As amostras de plasma especificamente destinadas a determinações hormonais devem colher-se à mesma hora do dia. Os conjuntos existentes no comércio para determinar concentrações hormonais podem dar valores diferentes.

Patologia

Autópsia macroscópica

45. No momento da eutanásia ou da morte durante o estudo, os animais adultos são objeto de um exame macroscópico, a fim de se detetarem quaisquer anomalias estruturais ou modificações patológicas. Deve prestar-se especial atenção aos órgãos do sistema reprodutivo. O número de locais de implantação deve ser registado. Os esfregaços vaginais devem ser examinados na manhã do dia da autópsia, para determinar a fase do ciclo éstrico e permitir a correlação com a histopatologia dos ovários.
46. Os testículos e os epidídimos, bem como a próstata e as vesículas seminais, com as glândulas coagulantes, de todos os machos adultos devem ser limpos de qualquer tecido aderente, conforme adequado, e o seu peso líquido deve ser determinado logo que possível após a dissecação, para evitar a secagem. Além disso, os pesos de órgãos facultativos podem incluir o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, as glândulas de Cowper e a glândula peniana, nos machos, e os ovários (em peso húmido) e o útero (incluindo o colo do útero), nas fêmeas;
47. As crias mortas e as crias eutanasiadas até ao dia 13 após o parto ou pouco depois, devem, pelo menos, ser cuidadosamente examinadas externamente para efeitos de deteção de anomalias macroscópicas. O aparelho reprodutor externo deve ser objeto de especial atenção, devendo ser inspecionado para a deteção de sinais de alterações no desenvolvimento. No dia 13, deve conservar-se a tiroide de uma cria macho e de uma cria fêmea por ninhada.

48. Devem conservar-se os ovários, os testículos, os órgãos sexuais secundários (útero e colo do útero, epidídimos, próstata, vesículas seminais e glândulas de coagulação), a tiroide e todos os órgãos com lesões macroscópicas de todos os animais adultos. A fixação em formalina não é recomendada para o exame de rotina dos testículos e dos epidídimos. A utilização de fixador de Bouin ou de Davidatos modificado constitui um método aceitável para estes tecidos (11). Para que o fixador penetre rapidamente, deve puncionar-se superficialmente a túnica albugínea com uma agulha, com cuidado, em ambos os polos do órgão.

Histopatologia

49. Devem ser efetuados exames histológicos pormenorizados aos ovários, aos testículos e aos epidídimos (com especial ênfase nas fases da espermatogénese e na histopatologia da estrutura celular testicular intersticial) dos animais do grupo de dosagem mais elevada e do grupo de controlo. Os outros órgãos conservados, incluindo a tiroide das crias e dos animais adultos, podem ser examinados, se necessário. A pesagem da tiroide pode realizar-se após fixação. A remoção dos tecidos aderentes à tiroide deve efetuar-se com muito cuidado e também só depois da fixação, para evitar danificar tecidos, o que, a ocorrer, poderia comprometer a análise histopatológica. Os exames devem ser alargados aos animais de outros grupos de dosagens, quando forem observadas alterações no grupo de dosagem mais elevada. O documento com a referência 11, que contém orientações no domínio da histopatologia, dá mais informações sobre a dissecação, a fixação, a colheita de amostras e a histopatologia de tecidos do sistema endócrino.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

50. Devem apresentar-se os dados individuais para cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de ensaio, o número de animais no início deste, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou abatidos por intervenção humana, a hora da morte de cada animal, a descrição e evolução temporal dos efeitos tóxicos, o número de animais férteis, o número de fêmeas prenhes, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados, incluindo o momento em que surgiram, a duração e a gravidade dos eventuais efeitos tóxicos, os tipos de alterações histopatológicas e quaisquer dados relevantes sobre a ninhada. No apêndice 3 figura um modelo de relatório sob a forma de tabela, que se tem revelado muito útil para a avaliação de efeitos na reprodução/no desenvolvimento.
51. Devido às dimensões limitadas do estudo, as análises estatísticas, sob a forma de ensaios de «significância», têm um valor limitado para muitos parâmetros, em especial os parâmetros de reprodução. Se se utilizarem análises estatísticas, o método escolhido deve ser adequado à distribuição da variável examinada, que importa selecionar antes do início do estudo. A análise estatística da DAG e da retenção de mamilo deve basear-se em dados individuais das crias, tendo em conta os efeitos da ninhada. Se for adequado, a ninhada é escolhida como unidade de análise. A análise estatística do peso corporal das crias deve basear-se nos dados relativos a cada indivíduo, tendo em conta o tamanho da ninhada. Devido ao pequeno tamanho do grupo, a utilização de dados históricos de controlo (por exemplo, para o tamanho das ninhadas), quando disponíveis, pode também ser útil para auxiliar a interpretação do estudo.

Avaliação dos resultados

52. As conclusões do estudo de toxicidade devem ser ponderadas com base nos efeitos observados, na autópsia e nos resultados microscópicos. A análise deverá considerar a relação (ou a ausência de relação) entre a dose do produto químico em estudo e a presença ou ausência, incidência e gravidade de anomalias, incluindo lesões macroscópicas, órgãos identificados como alvos, infertilidade, alterações na reprodução e na procriação, alterações do peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos.
53. Devido ao período reduzido de tratamento dos machos, a histopatologia dos testículos e dos epidídimos deve ser analisada juntamente com os dados de fertilidade, aquando da avaliação dos efeitos para a reprodução masculina. A utilização de dados históricos de controlo sobre a reprodução/o desenvolvimento (por exemplo, para o tamanho da ninhada, a DAG, a retenção de mamilo, os níveis séricos de T4), quando disponíveis, pode também ser útil para auxiliar a interpretação do estudo.
54. Para fins de controlo de qualidade, propõe-se a compilação de dados de controlo históricos e o cálculo de coeficientes de variação dos dados numéricos, especialmente no caso dos parâmetros relacionados com a deteção de perturbadores do sistema endócrino. Estes dados podem ser utilizados para fins comparativos na avaliação de estudos reais.

Relatório de ensaio

55. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida
- estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas pertinentes dos componentes.

Veículo (se adequado):

- Justificação da escolha do veículo, se não for aquoso;

Animais utilizados no ensaio:

- espécie e estirpe utilizadas;
- número, idade e sexo dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;
- peso individual dos animais no início do ensaio
- caso não sejam utilizadas ratazanas, justificação do recurso a outra espécie.

Condições de realização do ensaio:

- fundamentação da escolha das doses;
- elementos relativos à formulação do produto químico em estudo e/ou à incorporação do mesmo na alimentação dos animais; concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;
- elementos relativos à administração do produto químico em estudo;
- se pertinente, equivalência entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber, expressa em ppm, e a dose real, expressa em mg/kg de peso corporal/dia,

- elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada do processo de aleatorização para selecionar as crias para abate, se o abate for seletivo.

Resultados:

- pesos corporais e alterações de peso corporal;
- consumo de alimentos e consumo de água, se disponíveis;
- reações tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente fertilidade, gestação e outros sinais de toxicidade;
- duração do período de gestação;
- efeitos tóxicos (ou outros) na reprodução, descendência, crescimento pós-natal, etc.;
- natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis),
- número de fêmeas adultas com ciclo éstrico normal ou anormal e duração do ciclo;
- número de nados-vivos e de perdas pós-implantação;
- dados relativos à massa corporal da cria;
- DAG de todas as crias (e peso corporal no dia da medição da DAG);
- retenção de mamilo em crias do sexo masculino,
- níveis das hormonas da tiroide no dia 13, para as crias e os machos adultos (bem como para as mães e as crias no dia 4, caso tenham sido medidos)
- número de crias com anomalias macroscópicas visíveis, avaliação bruta dos órgãos genitais externos, número de crias significativamente menores do que as crias de controlo correspondentes;
- momento do óbito durante o estudo ou indicação de que os animais sobreviveram até ao término do estudo;
- número de implantações, dimensão da ninhada e pesos da ninhada no momento do registo;
- peso corporal no momento da eutanásia e peso dos órgãos dos animais progenitores;
- resultados das autópsias;
- descrição pormenorizada das observações histopatológicas;

- dados de absorção (se disponíveis);
- tratamento estatístico dos resultados, se for o caso.

Discussão dos resultados

Conclusões

Interpretação dos resultados

56. O estudo fornece avaliações da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento associada à administração de doses repetidas (ver pontos 5 e 6). Pode dar uma indicação da necessidade de realizar mais estudos e fornece orientações para a conceção dos estudos subsequentes. Deve consultar-se o documento de orientações 43 da OCDE para a interpretação dos resultados sobre a reprodução e o desenvolvimento (12). O documento de orientações 106 da OCDE sobre a avaliação histológica dos ensaios endócrinos e de reprodução em roedores (11) fornece informações sobre a preparação e a avaliação de órgãos endócrinos e de esfregaços vaginais, que podem ser úteis no contexto da presente *Test Guideline*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.
- (2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponível mediante pedido na Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris.
- (3) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Disponível mediante pedido na Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris.
- (4) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OCDE (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.
- (8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- (9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

-
- (10) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
 - (11) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
 - (12) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES (VER TAMBÉM A TEST GUIDELINE 150 DA OCDE) (6)

Atividade anfrogénica: capacidade de um produto químico de agir como uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona), num mamífero.

Atividade antiandrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona), num mamífero.

Atividade antiestrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona estrogénica natural (por exemplo, o 17 β -estradiol), num mamífero.

Atividade antitiroideia: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T₃), num mamífero.

Atividade estrogénica: capacidade de um produto químico de agir como hormona estrogénica natural (por exemplo o 17 β -estradiol), num mamífero.

Atividade tiroideia: capacidade de um produto químico de agir como uma hormona da tiroide natural (por exemplo a T₃), num mamífero.

Diminuição da fertilidade: reflete perturbações de funções ou capacidades reprodutoras masculinas ou femininas.

Dosagem: termo geral que abrange a dose, a frequência desta e o tempo de aplicação da mesma.

Dose: quantidade de produto químico em estudo administrada. Exprime-se em peso diário do produto químico por unidade de peso corporal do animal em estudo (por exemplo, mg/kg de peso corporal/dia), ou sob a forma de uma concentração constante na dieta.

NOAEL: abreviatura de «No Observed Adverse Effect Level» («nível sem observação de efeitos nocivos»); constitui a dose máxima cuja exposição não produz efeitos nocivos observáveis.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Toxicidade para o desenvolvimento: manifestação de toxicidade reprodutiva, sob a forma de perturbações estruturais pré-natal, peri-natal e pós-natal ou perturbações funcionais nos descendentes.

Toxicidade evidente: termo geral que descreve a existência de sinais claros de toxicidade após a administração do produto químico em estudo. Os sinais em causa devem ser suficientes para a avaliação dos perigos e devem permitir prever que o aumento da dose administrada provoque o aparecimento de sinais intensos de toxicidade e provável mortalidade.

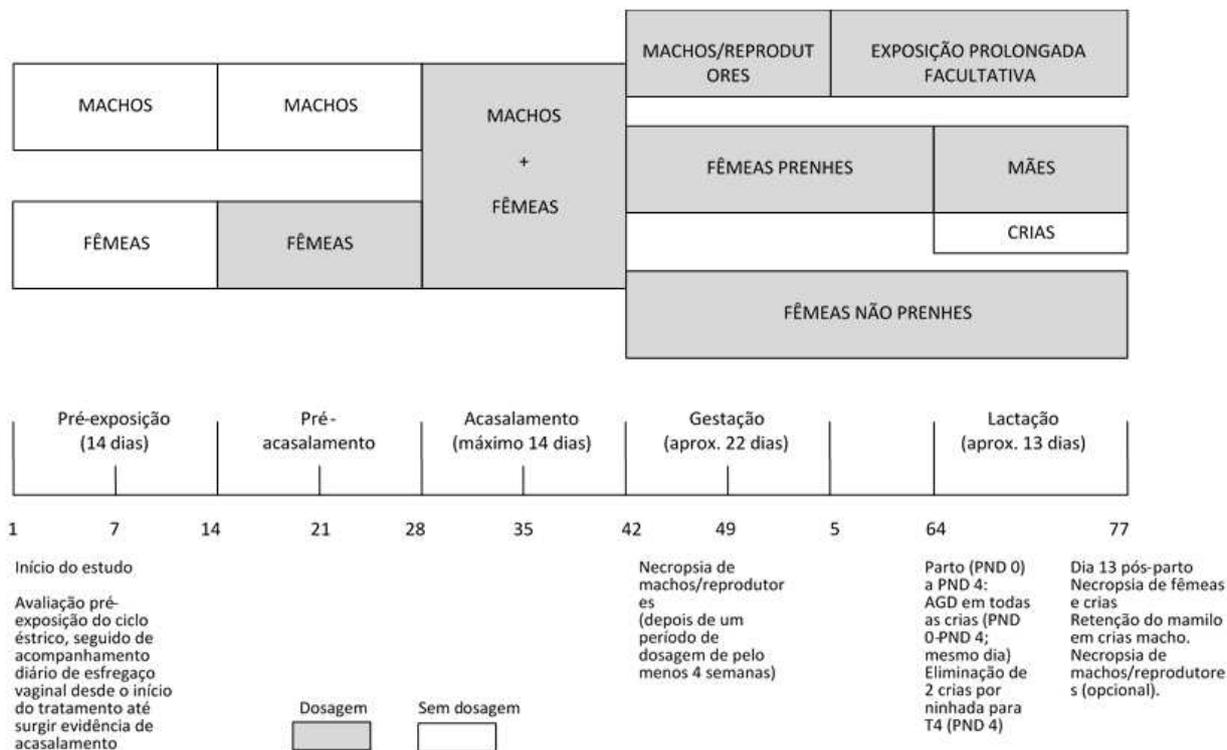
Toxicidade materna: efeitos nocivos em fêmeas grávidas, quer ocorram especificamente (efeitos diretos) ou não especificamente (efeitos indiretos).

Toxicidade para a reprodução: designa efeitos prejudiciais na descendência e/ou perturbações de funções ou capacidades reprodutoras masculinas ou femininas.

Validação: processo científico concebido para caracterizar as limitações e os imperativos operacionais de um método de ensaio e demonstrar a fiabilidade e pertinência do mesmo para um determinado fim.

Apêndice 2

DIAGRAMA DO CALENDÁRIO EXPERIMENTAL, COM INDICAÇÃO DA DURAÇÃO MÁXIMA DO ESTUDO – PERÍODO TOTAL DE ACASALAMENTO DE 14 DIAS



Apêndice 3

RELATÓRIO DE SÍNTESE SOBRE OS EFEITOS NA REPRODUÇÃO/NO DESENVOLVIMENTO

OBSERVAÇÕES	VALORES				
	0 (controlo)
Dosagem (unidades)					
Pares iniciais (N)					
Ciclo éstrico (pelo menos, a duração média e a frequência de ciclos irregulares)					
Fêmeas que apresentam indícios de cópula-ção (N)					
Fêmeas que engravidaram (N)					
Conceção nos dias 1-5 (N)					
Conceção nos dias 6 -... ⁽¹⁾ (N)					
Gestação ≤ 21 dias (N)					
Gestação = 22 dias (N)					
Gestação ≥ 23 dias (N)					
Mães com nados-vivos (N)					
Mães com nados-vivos no dia 4 pp (N)					
Implantes/mãe (média)					
Crias vivas/mãe à nascença (média)					
Crias vivas/mãe no dia 4 (média)					
Rácio sexual (m/f) à nascença (média)					
Rácio sexual (m/f), no dia 4 (média)					
Peso da ninhada à nascença (média)					
Peso da ninhada no dia 4 (média)					
Peso da cria à nascença (média)					
Peso da cria no momento da medição da DAG (média dos machos, média das fêmeas).					

OBSERVAÇÕES	VALORES				
Dosagem (unidades)	0 (controlo)
DAG da cria no mesmo dia, dia 4 após o nascimento (média dos machos, média das fêmeas, nota PND)					
Peso das crias no dia 4 (média)					
Retenção de mamilo das crias do sexo masculino no dia 13 (média)					
Peso das crias no dia 13 (média)					
CRIAS ANORMAIS					
Mães com 0					
Mães com 1					
Mães com ≥ 2					
PERDA DE CRIAS					
Implantações pré-natais/pós-natais (implantações menos nados-vivos)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					
Pós-natal (nados-vivos menos vivos no dia 13 pós-natal)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					
(1) Último dia do período de acasalamento					

B.64 ESTUDO DA TOXICIDADE DE DOSE REPETIDA COMBINADO COM O ENSAIO DE RASTREIO DA TOXICIDADE PARA A REPRODUÇÃO/O DESENVOLVIMENTO

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline 422* (2016) da OCDE. As diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos são revistas periodicamente à luz do progresso científico. A diretriz original para o ensaio, n.º 422, foi adotada em 1996, com base num protocolo denominado *Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test*, debatido em duas reuniões de peritos, realizadas em Londres, em 1990 (1), e em Tóquio, em 1992 (2).
2. O presente método combina uma parte de verificação da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento que se baseia na experiência adquirida nos Estados-Membros com a utilização do método original para os produtos químicos existentes com elevado volume de produção e com ensaios exploratórios com substâncias de controlo positivo (3) (4), com uma parte relativa à toxicidade de dose repetida, em conformidade com a *Test Guideline 407* da OCDE (*Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents*, correspondente ao capítulo B.7 deste anexo).
3. O presente método de ensaio foi atualizado com parâmetros relativos a perturbadores do sistema endócrino, na sequência da atividade altamente prioritária da OCDE, iniciada em 1998, de revisão das diretrizes de ensaio existentes e elaboração de novas orientações para a análise e o ensaio de potenciais perturbadores do sistema endócrino (5). Neste contexto, a *Test Guideline 407* (correspondente ao capítulo B.7 deste anexo) foi melhorada em 2008 com parâmetros adequados para detetar a atividade endócrina de produtos químicos em estudo. O objetivo da atualização da *Test Guideline 422* era incluir alguns parâmetros relevantes no rastreio dos perturbadores do sistema endócrino nas *Test Guidelines* cujos períodos de exposição abrangem alguns dos períodos sensíveis do desenvolvimento (período pré-natal e primeira fase do período pós-natal).
4. A *Test Guideline 443* (estudo alargado de toxicidade reprodutiva uma geração, correspondente ao capítulo B.56 deste anexo) foi incluída na *Test Guideline 422* com base num estudo de viabilidade relativo a questões científicas e técnicas relacionadas com a inclusão, bem como eventuais adaptações da conceção do ensaio necessárias para a mesma (6).
5. O presente método de ensaio destina-se a produzir informações limitadas sobre os efeitos de um produto químico em estudo no desempenho reprodutor masculino e feminino, como a função gonadal, o comportamento de acasalamento, a fecundação e o desenvolvimento do feto e o parto. Não constitui uma alternativa aos métodos de ensaio B.31, B.34, B.35 ou B.56, nem os substitui.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

6. Na apreciação e avaliação das características de toxicidade de produtos químicos em estudo pode determinar-se a toxicidade oral por dose repetida depois de se obterem informações sobre a toxicidade aguda a partir de ensaios realizados para o efeito. O presente estudo fornece informações sobre os possíveis riscos para a saúde de uma exposição repetida num período relativamente limitado. O método compreende um estudo básico de toxicidade por dose repetida, que pode utilizar-se para produtos químicos que não justifiquem um estudo a 90 dias (por exemplo, se o volume de produção não exceder determinados limites) ou como estudo exploratório com vista a um estudo a longo prazo. Na realização do estudo, devem seguir-se os princípios de orientação e as considerações descritas no documento de orientações n.º 19 da OCDE quanto ao reconhecimento, avaliação e utilização dos sinais clínicos como parâmetros de tratamento humano para experiências com animais utilizados em avaliações de segurança (7).
7. O estudo inclui ainda um ensaio de despistagem da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento; por conseguinte, pode também ser utilizado para fornecer informações preliminares sobre possíveis efeitos no desempenho reprodutor dos machos e das fêmeas, como a função gonadal, o comportamento de acasalamento, a fecundação e o desenvolvimento do feto e o parto, quer numa fase inicial de avaliação das propriedades toxicológicas dos produtos químicos em estudo, quer no ensaio de produtos químicos que suscitam preocupação. O método de ensaio não fornece informações completas sobre todos os aspetos da reprodução e do desenvolvimento. Proporciona apenas, nomeadamente, meios limitados para a deteção de manifestações pós-natais de exposição pré-natal ou de efeitos que possam ser induzidos durante a exposição pós-natal. Devido, entre outros motivos, ao número relativamente reduzido de animais dos grupos de dosagem, à seletividade dos parâmetros e à curta duração do estudo, o método não fornece dados que apoiem a declaração definitiva de inexistência de efeitos na reprodução/no desenvolvimento. Além disso, na ausência de dados de outros ensaios de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento, os resultados positivos são úteis para a avaliação preliminar dos perigos e contribuem para fundamentar as decisões quanto à necessidade e à oportunidade de realizar ensaios adicionais.

8. Os resultados correspondentes aos parâmetros relacionados com o sistema endócrino devem interpretar-se com base no documento *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* (8), elaborado pela OCDE, que estabelece um quadro conceitual para o ensaio e a avaliação de produtos químicos perturbadores do sistema endócrino. Nesse quadro, o método correspondente à *Test Guideline* 422 da OCDE melhorada consta do nível 4, constituindo um ensaio *in vivo* que fornece dados sobre efeitos nocivos em determinados parâmetros do sistema endócrino. Contudo, um sinal do sistema endócrino não pode, por si só, ser considerado prova suficiente de que o produto químico em estudo é um perturbador desse sistema.
9. O método confere especial importância aos efeitos neurológicos, devendo efetuar-se um exame clínico pormenorizado dos animais, de modo a obter o máximo possível de informações. Deve permitir identificar substâncias com potencial neurotóxico passíveis de necessitarem de uma investigação mais aprofundada. Além disso, pode também fornecer uma indicação básica dos efeitos imunológicos.
10. Na ausência de dados de outros estudos de toxicidade sistémica, de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento, de neurotoxicidade e/ou de imunotoxicidade, os resultados positivos são úteis para a avaliação preliminar dos perigos e contribuem para fundamentar as decisões relativas à necessidade e à oportunidade de ensaios adicionais. O ensaio pode ser particularmente útil no âmbito do *Screening Information Data Set* (conjunto de dados de informação de despistagem) da OCDE para a avaliação dos produtos químicos existentes relativamente aos quais existe pouca ou nenhuma informação toxicológica, podendo também servir de alternativa à realização de dois ensaios separados de toxicidade de dose repetida (*Test Guideline* 407 da OCDE, que corresponde ao capítulo B.7 deste anexo) e de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento (*Test Guideline* 421 da OCDE, que corresponde ao capítulo B.63 deste anexo), respetivamente. Pode também ser utilizado como estudo exploratório de determinação da gama de dosagens para estudos mais exaustivos sobre a reprodução/o desenvolvimento, ou sempre que isso for considerado relevante.
11. Em geral, parte-se do princípio de que existem diferenças de sensibilidade entre os animais prenhes e não prenhes. Por isso, pode ser mais complexo determinar no ensaio combinado dosagens adequadas para avaliar tanto a toxicidade sistémica generalizada como a toxicidade específica para a reprodução/o desenvolvimento do que em ensaios realizados separadamente. Além disso, a interpretação dos resultados dos ensaios, no que respeita à toxicidade sistémica geral, pode ser mais difícil do que quando é realizado um estudo separado de doses repetidas, sobretudo se os parâmetros séricos e histopatológicos não forem avaliados em simultâneo no estudo. Devido a estas complexidades técnicas, é necessária uma experiência considerável em ensaios de toxicidade para realizar o ensaio combinado. Por outro lado, além do recurso a um número inferior de animais, o ensaio combinado pode constituir um meio mais adequado para distinguir os efeitos diretos na reprodução/no desenvolvimento dos efeitos secundários em relação a outros efeitos (sistémicos).
12. No presente ensaio, o período de dosagem é mais longo do que num estudo convencional de dose repetida com 28 dias. No entanto, utiliza menos animais de cada sexo por grupo do que os estudos convencionais de dose repetida a 28 dias realizados em complemento a ensaios da toxicidade na reprodução/no desenvolvimento.
13. O presente método prevê a administração por via oral do produto químico em estudo. Pode ser necessário introduzir alterações se forem utilizadas outras vias de exposição.
14. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.
15. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

16. O produto químico em estudo é administrado, em doses escalonadas, a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos devem ser tratados durante, pelo menos, quatro semanas, até ao dia anterior ao da eutanásia, inclusive, o que abrange, no mínimo, duas semanas antes do acasalamento, o período de acasalamento e aproximadamente duas semanas após o acasalamento. Tendo em conta o período limitado de dosagem pré-acasalamento dos machos, a fertilidade pode não constituir um indicador particularmente sensível da toxicidade testicular. Por conseguinte, é

essencial um exame histológico pormenorizado dos testículos. A combinação de um período de dosagem pré-acasalamento de duas semanas e de observações subsequentes de acasalamento/fertilidade com um período global de dosagem de, pelo menos, quatro semanas, seguido de histopatologia pormenorizada das gónadas do macho, é considerada suficiente para permitir a deteção da maioria dos efeitos na fertilidade masculina e na espermatogénese.

17. As fêmeas devem ser tratadas ao longo de todo o estudo, ou seja, duas semanas antes do acasalamento – com o objetivo de abranger, pelo menos, dois ciclos éstricos completos –, o período variável até à conceção, a gravidez e, pelo menos, treze dias após o parto, até ao dia anterior ao da eutanásia, inclusive.
18. A duração do estudo, após a aclimatização, com uma avaliação do ciclo éstrico efetuada antes do início do tratamento, depende do desempenho das fêmeas, e é de cerca de 63 dias, [pelo menos 14 dias antes do acasalamento, até 14 dias de acasalamento, 22 dias de gestação, 13 dias de aleitamento].
19. No decurso do período de administração, verifica-se atentamente, todos os dias, se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Os que morrem ou são eutanasiados no período de ensaio são autopsiados; no final do ensaio, são eutanasiados e autopsiados os animais sobreviventes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção de espécies animais

20. O presente método de ensaio foi concebido para ratazanas. Se os parâmetros que nele se especificam forem estudados noutra espécie de roedor, essa opção deve ser justificada pormenorizadamente. A ratazana foi a única espécie utilizada no programa internacional de validação da deteção de perturbadores do sistema endócrino (TG 407). Deve evitar-se a utilização de estirpes de fecundidade baixa ou nas quais se verifique uma incidência elevada de deficiências de desenvolvimento. Devem utilizar-se animais virgens saudáveis, não sujeitos a experiências anteriores. Importa especificar a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais utilizados. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio dos animais de cada sexo. Nos casos em que for realizado como estudo preliminar de um estudo a longo prazo ou numa geração, é preferível utilizar animais da mesma estirpe e proveniência em ambos os estudos.

Condições de alojamento e de alimentação

21. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve ser, no mínimo, de 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. A escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de garantir uma mistura adequada do produto químico em estudo, quando administrado por essa via.
22. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo. Os animais podem ser alojados individualmente, se tal se justificar do ponto de vista científico. Em caso de alojamento coletivo, cada gaiola não deve alojar mais de cinco animais. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. As fêmeas prenhes devem ser colocadas em gaiolas individuais e dispor de materiais de nidificação. As fêmeas em lactação devem ser colocadas em gaiolas individuais com as crias.
23. Deve efetuar-se com regularidade uma pesquisa de contaminantes nos alimentos fornecidos e conservar-se uma amostra da dieta até o relatório estar concluído.

Preparação dos animais

24. Os animais adultos jovens e saudáveis são repartidos ao acaso pelos grupos de tratamento e por gaiolas. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos decorrentes do seu posicionamento. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias antes de se iniciar o estudo.

Preparação das doses

25. Recomenda-se a consulta do PON aquando da implementação e utilização de um desses modelos no laboratório. Se for selecionada a via oral, o produto químico em estudo é geralmente administrado por gavagem; no entanto, os produtos podem ser administrados através dos alimentos ou da água de beber.

26. Se necessário, o produto químico em estudo pode ser dissolvido ou suspenso num veículo adequado. Recomenda-se que, sempre que possível, se opte por uma solução ou suspensão aquosa; caso isso não seja viável, pode optar-se por uma solução ou suspensão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, pode recorrer-se a uma solução noutra veículo. Se este não for aquoso, devem conhecer-se as suas características de toxicidade. Importa determinar a estabilidade e a homogeneidade do produto químico em estudo no veículo.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

27. Recomenda-se que cada grupo seja iniciado com, pelo menos, 10 machos e 12-13 fêmeas. As fêmeas serão avaliadas para pré-exposição do ciclo éstrico; os animais que não apresentem ciclos típicos de 4-5 dias não são incluídos no estudo. Assim, é recomendável utilizar um número mais elevado de fêmeas, a fim de assegurar a presença de 10 fêmeas reprodutoras por grupo. Exceto no caso de efeitos tóxicos marcados, prevê-se que o número de fêmeas prenhes por grupo seja, no mínimo, igual a 8, que, normalmente, é o número mínimo aceitável de fêmeas prenhes por grupo. O objetivo é produzir gravidezes e crias em número suficiente para assegurar uma avaliação significativa do potencial do produto químico em estudo para afetar a fertilidade, a gravidez, o comportamento materno e de aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F₁, desde a fecundação até ao dia 13 pós-parto. Caso se preveja a eutanásia de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar. Deve ponderar-se a possibilidade de constituir um grupo-satélite adicional de cinco animais de cada sexo nos grupos de controlo e de dose máxima, para observar a reversibilidade, a persistência ou a ocorrência tardia de efeitos tóxicos sistémicos, durante, pelo menos, 14 dias após o tratamento. Os animais dos grupos-satélite não devem acasalar, pelo que não são utilizados na avaliação da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento.

Dosagem

28. De modo geral, devem utilizar-se, no mínimo, três lotes de ensaio e um lote de controlo. Se não se dispuser de dados gerais de toxicidade adequados, pode efetuar-se um estudo exploratório, com animais da mesma estirpe e proveniência, para facilitar a determinação das doses a utilizar. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais dos grupos de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos de ensaio. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado.
29. Na seleção das doses devem ter-se em conta os dados eventualmente disponíveis em matéria de toxicidade e toxicocinética. Importa também ter em conta o facto de poder haver diferenças de sensibilidade entre animais prenhes e não prenhes. Deve escolher-se como dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, mas não cause mortalidade nem sofrimento evidente. Posteriormente, deve selecionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objetivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reação, bem como a ausência de efeitos nocivos associados à administração da dose mais reduzida. O intervalo ótimo entre doses consecutivas é frequentemente definido por um fator de 2 a 4. A inclusão de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (fatores superiores a 10).
30. Caso se observem sinais de toxicidade generalizada (por exemplo, redução do peso corporal, efeitos ao nível hepático, cardíaco, pulmonar ou renal, etc.) ou outras alterações que possam não ser reações tóxicas (por exemplo, diminuição da quantidade de alimentos ingerida, dilatação hepática, etc.), deverá interpretar-se com cautela qualquer efeito observado ao nível dos parâmetros endócrinos.

Ensaio no limite

31. Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de massa corporal/dia ou – no caso da administração através dos alimentos ou da água para beber – uma percentagem equivalente em relação aos mesmos (com base na determinação da massa corporal), não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se prever a ocorrência de efeitos tóxicos, pode não ser necessário efetuar um estudo completo com várias doses. Nesses casos, justifica-se a realização de um ensaio no limite, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores. Caso se usem outras formas de administração, como a inalação ou a aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas do produtos químico de ensaio são muitas vezes indicativas e limitativas do nível máximo de exposição praticável.

Administração das doses

32. Os animais são tratados diariamente com o produto químico em estudo, durante uma semana. A administração forçada por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se numa dose única, utilizando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal. O volume máximo de líquido que pode ser administrado numa toma depende também do

tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Exceto no caso de produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente revelam efeitos exacerbados em concentrações superiores, a variabilidade no volume de ensaio deve ser minimizada ajustando a concentração de modo a garantir um volume constante em todos os níveis de dosagem.

33. No caso de produtos administrados através da alimentação ou da água de beber, é importante assegurar que as quantidades do produto não interferem com a nutrição normal ou com a composição da água. Se o produto for administrado na alimentação, pode optar-se por concentrações constantes desta (da ordem das ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal de cada animal. Se o produto químico em estudo for administrado por gavagem, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ajustar-se, pelo menos, uma vez por semana a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal; caso o estudo combinado de toxicidade oral da dose repetida preceda um estudo a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

Calendário da experiência

34. O tratamento de ambos os sexos deve ter início 2 semanas antes do acasalamento, depois de os animais serem aclimatados durante, pelo menos, 5 dias e as fêmeas serem sujeitas a exames de deteção de ciclos éstricos normais (num período de 2 semanas anterior ao tratamento). O estudo deve ser programado de forma a que a avaliação do ciclo éstrico comece pouco depois de os animais terem atingido a plena maturidade sexual, o que pode variar ligeiramente nas diferentes linhagens de ratazanas em laboratórios diferentes, sendo, por exemplo, às 10 semanas nas ratazanas Sprague Dawley e cerca das 12 semanas nas ratazanas Wistar. As mães com crias devem ser eutanasiadas no dia 13 após o parto, ou pouco depois. Para permitir que os animais jejem desde a véspera da colheita de sangue (caso seja preferível esta opção), as mães e as crias não têm necessariamente de ser abatidas no mesmo dia. O dia de nascimento (ou seja, quando o parto é concluído) é definido como o dia 0 após o parto. As fêmeas que não apresentem qualquer indício de copulação são mortas 24 a 26 dias após o último dia do período de acasalamento. O nível de dosagem é mantido em ambos os sexos durante o período de acasalamento. Os machos devem continuar a ser tratados após o período de acasalamento, pelo menos até ter decorrido o período total mínimo de dosagem, de 28 dias. Em seguida, são eutanasiados ou, em alternativa, são mantidos e continuam a ser tratados, para um eventual segundo acasalamento, se isso for considerado adequado.
35. As fêmeas prenhes devem continuar a ser tratadas durante a gravidez e, pelo menos, até ao dia 13 após o parto ou ao dia anterior ao abate. No caso de o produto químico em estudo ser administrado por inalação ou por via cutânea, o tratamento deve continuar a ser administrado pelo menos até ao dia 19 de gestação, inclusive, e ser retomado o mais rapidamente possível, o mais tardar no dia 4 após o parto.
36. Os animais de grupos-satélite com observações subsequentes, caso sejam utilizados, não acasalam. Devem ser mantidos durante, pelo menos, 14 dias após o primeiro abate programado de mães, sem tratamento que permita detetar a ocorrência tardia, a persistência ou a superação dos efeitos tóxicos.
37. O apêndice 2 apresenta um diagrama do calendário da experiência.

Ciclos éstricos

38. Os ciclos éstricos devem ser monitorizados antes do início do tratamento, de forma a selecionar para o estudo fêmeas com um ciclo regular (ver ponto 27). Os esfregaços vaginais também devem ser monitorizados diariamente desde o início do período de tratamento, até haver indicações de acasalamento. Se houver preocupações quanto a efeitos agudos ligados ao *stress* que possam alterar os ciclos éstricos com o início do tratamento, os laboratórios podem expor os animais durante 2 semanas, e em seguida colher esfregaços vaginal diariamente, a fim de monitorizar o ciclo éstrico durante, pelo menos, duas semanas durante o período de pré-acasalamento e igualmente durante o período de acasalamento, até que haja provas de copulação. Aquando da colheita de células vaginais/cervicais, deve ter-se o cuidado de evitar perturbar a mucosa, o que pode induzir uma pseudogravidez (8) (9).

Processo de acasalamento

39. Normalmente, devem ser utilizados neste estudo acasalamentos de 1:1 (um macho e uma fêmea). Pode haver exceções em caso de morte ocasional de machos. A fêmea deve ser colocada com o mesmo macho até se observarem indícios de copulação ou terem decorrido duas semanas. Devem examinar-se as fêmeas todas as manhãs, para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gravidez é definido como o dia em que é confirmada a evidência de acasalamento (deteção de rolhão vaginal ou esperma). Se a tentativa de acasalamento for mal sucedida, poderá tentar-se um novo acasalamento das fêmeas com machos do mesmo grupo comprovadamente aptos a procriar.

Número de animais por ninhada

40. No dia 4 após o parto, o número de animais de cada ninhada pode ser ajustado, eliminando as crias excessivas por seleção aleatória, a fim de se obter, tão perto quanto possível, quatro ou cinco crias por sexo e por ninhada, consoante o tamanho normal das ninhadas das estirpes de ratazanas utilizadas. Devem ser colhidas amostras de sangue de duas das crias excedentárias, que serão agrupadas e utilizadas para a determinação dos níveis do soro T4. Não é adequada a eliminação seletiva das crias, por exemplo, com base no peso corporal ou na distância anogenital (DAG). Sempre que o número de crias do sexo masculino ou feminino impeça a obtenção de quatro ou cinco animais de cada sexo por ninhada, é admissível um ajustamento parcial – por exemplo, seis machos e quatro fêmeas. Não devem ser eliminadas crias se as ninhadas ficarem aquém da meta de abate (8 ou 10 crias/ninhada). Se existir uma única cria além da meta de abate, apenas uma cria deve ser eliminada e utilizada para a colheita de sangue com vista a possíveis avaliações séricas de T4.
41. Se o tamanho da ninhada não for ajustado, eutanasiem-se duas crias por ninhada no dia 4 após o nascimento e colhem-se amostras de sangue para medição das concentrações de hormonas da tiroide. Se possível, essas duas crias de cada ninhada devem ser fêmeas, a fim de reservar as crias do sexo masculino para as avaliações de retenção de mamilo, exceto se essas crias não deixarem outras fêmeas para avaliação no termo da experiência. Não devem ser eliminadas crias se a ninhada ficar com menos de 8 ou 10 crias (em função do tamanho normal das ninhadas das estirpes de ratazanas em causa). Se existir uma única cria além do tamanho normal das ninhadas, apenas uma cria deve ser eliminada e utilizada para a colheita de sangue destinada a possíveis avaliações séricas de T4.

Observações

42. Devem ser feitas observações clínicas gerais pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s), tendo em conta o período de pico de efeitos antecipados após a administração da dose. Deve registar-se o estado de saúde dos animais. Pelo menos, duas vezes por dia verificam-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais.
43. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado de cada animal progenitor antes da primeira exposição (para permitir comparações subsequentes com o estado inicial do animal) e, posteriormente, pelo menos uma vez por semana. O exame deve decorrer no exterior da gaiola, num recinto adequado e, de preferência, todos os dias à mesma hora. As observações devem ser cuidadosamente registadas, de preferência por recurso a um sistema definido em pormenor pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de ensaio sejam o mais constantes possível; os exames devem ser efetuados, de preferência, por pessoal que não esteja a par do ensaio realizado. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da forma de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo), partos difíceis ou prolongados ou comportamentos estranhos (automutilação, locomoção para trás, etc.) (10).
44. Num dado momento do estudo, deve proceder-se à avaliação da reação sensorial a diferentes estímulos (por exemplo, estímulos auditivos, visuais e proprioceptivos) (8) (9) (11), da força de prensão (12) e da atividade motora (13), em cinco machos e cinco fêmeas, selecionados aleatoriamente de cada grupo. As referências bibliográficas contêm mais informações sobre a forma de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos. Nos machos, as observações funcionais devem ser feitas perto do final do período de dosagem, pouco antes do abate programado, mas antes da colheita de amostras de sangue para hematologia ou química clínica (ver pontos 53-56, incluindo a nota de rodapé 1). As fêmeas devem encontrar-se num estado fisiológico semelhante durante estes ensaios funcionais e devem, de preferência, ser testadas uma vez durante a última semana de aleitamento (por exemplo, dias de aleitamento 6-13), pouco antes do seu abate programado. Na medida do possível, deve minimizar-se o tempo de separação das mães e das crias.
45. As observações funcionais efetuadas perto do final do estudo podem ser omitidas se o mesmo for realizado a título de estudo preliminar a um estudo posterior de toxicidade subcrónica (90 dias) ou a um estudo de longo prazo. Nesse caso, os exames funcionais devem realizar-se no estudo subsequente. Não obstante, os dados das observações funcionais efetuadas durante o estudo de dose repetida podem facilitar a escolha do nível de doses a utilizar no estudo de toxicidade subcrónica ou do estudo de longo prazo posterior.
46. A título excecional, podem também omitir-se as observações funcionais no caso dos grupos de animais que apresentem sinais de toxicidade cuja intensidade interferiria de modo significativo com o desempenho do ensaio.
47. A duração da gestação deve ser registada e calculada a partir do dia 0. Deve examinar-se cada ninhada o mais rapidamente possível após o parto, a fim de determinar o número e o sexo das crias, os nados-mortos, os nados-vivos, as crias que são significativamente inferiores às crias de controlo correspondentes e a presença de anomalias macroscópicas.
48. As crias vivas devem ser contadas e determinado o sexo de cada uma; as ninhadas devem ser pesadas nas 24 horas seguintes ao parto (dia 0 ou 1 após o parto) e, pelo menos, nos dias 4 e dia 13 pós-parto. Além das observações sobre os animais progenitores (ver pontos 43 e 44), deve registar-se qualquer comportamento anormal das crias.

49. A DAG de cada cria deve ser medida no mesmo dia pós-natal, entre o dia 0 e o dia 4. O peso corporal da cria deve ser medido no dia em que a DAG for medida e as DAG devem ser normalizadas de acordo com uma medida do tamanho da cria, preferencialmente a raiz cúbica do peso corporal (14). O número de mamilos/auréolas em crias do sexo masculino deve ser contado no dia 12 ou 13 após o nascimento, tal como recomendado na GD 151 (15) da OCDE.

Peso corporal e consumo de alimentos/água

50. Os machos e as fêmeas devem ser pesados no primeiro dia de tratamento, pelo menos uma vez por semana a partir de então e no final. Durante a gestação, as fêmeas devem ser pesadas nos dias 0, 7, 14 e 20 e nas 24 horas seguintes ao parto (dia 0 ou 1 pós-parto) e, pelo menos, nos dias 4 e 13 pós-parto. As observações devem ser registadas individualmente para cada animal adulto.
51. Durante o pré-acasalamento, a gestação e o aleitamento, o consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. A medição do consumo de alimentos durante o acasalamento é facultativa. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo de água deve também ser medido nestes períodos.

Hematologia

52. Durante o ensaio, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos de cinco machos e cinco fêmeas escolhidos aleatoriamente de cada grupo: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, reticulócitos, contagem total de leucócitos e fórmula leucocitária, contagem de plaquetas e tempo e potencial de coagulação. Caso o produto químico em estudo ou os seus metabolitos potenciais tenham, ou se suspeite que tenham, propriedades oxidantes, devem efetuar-se outras análises, como a determinação da concentração de meta-hemoglobina e de corpos de Heinz.
53. As amostras de sangue devem ser colhidas num determinado ponto. As fêmeas devem estar em condições fisiológicas semelhantes durante a colheita das amostras. A fim de evitar dificuldades práticas relacionadas com a variabilidade do início da gestação, a colheita de sangue das fêmeas pode ser feita no final do período de pré-acasalamento, e não imediatamente antes ou no âmbito do processo de eutanásia. De preferência, as amostras de sangue dos machos devem ser colhidas imediatamente antes ou como parte integrante do processo de eutanásia. Em alternativa, a colheita de sangue nos machos pode também ser feita no final do período de pré-acasalamento, se se optar por este momento para as fêmeas.
54. As amostras de sangue devem ser armazenadas em condições adequadas.

Bioquímica clínica

55. Devem efetuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com amostras de sangue dos cinco machos e cinco fêmeas escolhidos aleatoriamente em todos os grupos. Recomenda-se que os animais sejam jejuados desde a véspera da colheita de sangue ⁽¹⁾. Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glucose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, além de, pelo menos, duas enzimas indicadoras dos efeitos hepatocelulares (como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase e o sorbitol-desidrogenase). Em certos casos, a determinação de outras enzimas (de origem hepática ou outra origem) e da bilirrubina pode fornecer informações úteis.
56. Em cada local, as amostras de sangue são colhidas com base no seguinte calendário:
- pelo menos, de duas crias por ninhada no dia 4 após o nascimento, se o número de crias o permitir (ver pontos 40 e 41)
 - de todas as mães e, pelo menos, duas crias por ninhada, no final (dia 13), e
 - de todos os machos adultos, no final.

Todas as amostras de sangue são armazenadas em condições adequadas. As amostras de sangue do dia 13 das crias e dos machos adultos são analisadas para a determinação dos níveis séricos de hormonas da tiroide (T4). Se necessário, procede-se a uma avaliação mais aprofundada de T4 nas amostras de sangue das mães e do dia 4 das crias. Em alternativa, podem ser medidas outras hormonas, se necessário. O sangue das crias pode ser agrupado por ninhada para a realização de análises das hormonas da tiroide. As hormonas da tiroide (T4 e TSH) devem ser, de preferência, medidas como «totais».

⁽¹⁾ No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejuem durante a noite. O principal motivo desta recomendação reside no facto de a maior variabilidade dos resultados que inevitavelmente ocorreria se os animais não jejuassem poder ocultar efeitos subtis e dificultar as interpretações. No entanto, por outro lado, o jejum desde a véspera pode interferir com o metabolismo geral das fêmeas (prenhes), perturba a lactação e o comportamento de aleitamento e – em especial nos estudos por via alimentar – pode perturbar a exposição diária ao produto químico em estudo. Assim, caso se opte pelo jejum desde a véspera, as análises bioquímicas devem ser efetuadas após observações funcionais a realizar na semana 4 do ensaio para os machos. As mães devem ser retidas por mais um dia após a retirada das crias em, por exemplo, PND 13). As mães devem estar sem comer de um dia para o outro a partir do dia de aleitamento 13-14 e o sangue terminal deve ser utilizado para parâmetros de química clínica.

57. Como opção, podem realizar-se na última semana do ensaio as seguintes análises de urina em cinco machos de cada grupo escolhidos aleatoriamente na última semana do estudo, recolhida de acordo com um programa previamente estabelecido: aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glucose e sangue/hematócitos.
58. Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Caso as propriedades conhecidas do produto químico em estudo afetem, ou se preveja que possam afetar, o perfil metabólico da mesma, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente de cálcio, fosfatos, triglicéridos em jejum e glucose em jejum, hormonas específicas, meta-hemoglobina e colinesterase. Estas determinações devem ser identificadas caso a caso.
59. Os fatores a seguir indicados podem afetar a variabilidade dos resultados das análises hormonais e as concentrações absolutas nelas determinadas:
 - momento da eutanásia, devido à variação das concentrações hormonais ao longo do dia,
 - método utilizado para eutanasiar os animais sem lhes causar tensões desnecessárias, que poderiam afetar as concentrações hormonais,
 - diferenças ao nível das curvas de calibração dos conjuntos para as determinações hormonais.
60. As amostras de plasma especificamente destinadas a determinações hormonais devem colher-se à mesma hora do dia. Os conjuntos existentes no comércio para determinar concentrações hormonais podem dar valores diferentes.
61. Se os dados históricos de base forem inadequados, deve ponderar-se a determinação da variabilidade dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais às doses previstas ou – o que será preferível – num conjunto de animais não incluídos nos grupos ensaiados. No caso das fêmeas, os dados devem dizer respeito a animais em lactação.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

62. Deve ser realizada a todos os animais adultos estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada, através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Deve prestar-se especial atenção aos órgãos do sistema reprodutivo. Deve registar-se o número de locais de implantação. Os esfregaços vaginais devem ser examinados na manhã do dia da autópsia para determinar a fase do ciclo éstrico e permitir a correlação com a histopatologia dos órgãos reprodutores femininos.
63. Os testículos e os epidídimos, bem como a próstata e as vesículas seminais, com as glândulas coagulantes, de todos os machos adultos devem ser limpos de qualquer tecido aderente, conforme adequado, e o seu peso húmido determinado logo que possível após a dissecação, para evitar a secagem. Além disso, os pesos de órgãos facultativos podem incluir o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, as glândulas de Cowper e a glândula peniana, nos machos, e os ovários (peso húmido) e o útero (incluindo o colo), nas fêmeas; devem conservar-se os ovários, os testículos, os epidídimos, os órgãos sexuais acessórios e todos os órgãos com lesões macroscópicas de todos os animais adultos.
64. Devem conservar-se, no meio de fixação mais adequado ao exame histopatológico subsequente previsto, as glândulas tiroideias de todos os machos e fêmeas adultos, bem como de uma cria de sexo masculino e de outra de sexo feminino, de cada ninhada, colhidas no 13.º dia de vida. A pesagem da tiroide pode realizar-se após fixação. A remoção dos tecidos aderentes à tiroide deve efetuar-se com muito cuidado e também só depois da fixação, para evitar danificar tecidos, o que, a ocorrer, poderia comprometer a análise histopatológica. As colheitas de sangue devem ser efetuadas num determinado ponto a indicar, imediatamente antes da eutanásia dos animais ou integradas nesta, e as amostras devem ser armazenadas em condições adequadas (ver ponto 56).
65. Além disso, o fígado, os rins, as glândulas suprarrenais, o timo, o baço, o cérebro e o coração de, pelo menos, cinco machos e fêmeas adultos escolhidos aleatoriamente em cada grupo (excluindo os animais moribundos e/ou eutanasiados antes do termo do estudo) devem ser limpos de qualquer tecido aderente, de forma adequada, e o seu peso húmido deve ser determinado logo que possível após a dissecação, para evitar a secagem. Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todas as lesões macroscópicas, o encéfalo (regiões representativas, incluindo os hemisférios cerebrais, o cerebelo e a protuberância anelar), a medula espinal, os olhos, o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso (incluindo as placas de Peyer), o fígado, os rins, as glândulas suprarrenais, o baço, o coração, o timo, a traqueia e os pulmões (conservados por injeção de fixador, seguida de imersão), as gónadas (testículos e ovários), os

órgãos sexuais secundários (útero e respetivo colo, epidídimos, próstata + vesículas seminais e glândulas de coagulação), a vagina, a bexiga urinária, os gânglios linfáticos – o gânglio linfático mais próximo e outro gânglio linfático, a selecionar em função da experiência anterior do laboratório (16), um nervo periférico (ciático ou tibial), de preferência na vizinhança do músculo, músculo esquelético e osso com medula óssea (corte ou, em alternativa, uma punção recente de medula óssea). Recomenda-se a fixação dos testículos por imersão em fixador de Bouin ou em fixador de Davidson modificado (16)(17)(18). A fixação em formalina não é recomendada para estes tecidos. Para que o fixador penetre rapidamente, deve puncionar-se superficialmente a túnica albugínea com uma agulha, com cuidado, em ambos os polos do órgão. Os resultados clínicos, ou outros, podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem ser conservados também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indicem que serão provavelmente afetados.

66. Os seguintes tecidos podem dar indicações úteis sobre efeitos ao nível do sistema endócrino: gónadas (ovários e testículos), órgãos sexuais secundários (útero – incluindo o colo –, epidídimos, vesículas seminais e glândulas de coagulação, bem como a próstata dorsolateral e ventral), vagina, hipófise, glândulas mamárias masculinas e glândulas suprarrenais. Não existe documentação suficiente sobre alterações das glândulas mamárias masculinas, mas este parâmetro pode ser muito sensível às substâncias com atividade estrogénica. A observação dos órgãos e tecidos não enumerados no ponto 65 é facultativa.
67. As crias mortas e as crias abatidas até ao dia 13 seguinte ao parto, ou pouco depois, devem, pelo menos, ser cuidadosamente examinadas externamente para a pesquisa de anomalias macroscópicas. O aparelho reprodutor externo deve ser objeto de especial atenção, devendo ser inspecionado para a pesquisa de sinais de alterações no desenvolvimento.

Histopatologia

68. Deve efetuar-se uma histopatologia completa dos órgãos e tecidos conservados dos animais selecionados dos grupos de controlo e de dose elevada (com especial destaque para as fases da espermatogénese nos machos e a histopatologia da célula testicular intersticial). A tiroide das crias e dos restantes animais adultos poderá ser examinada quando necessário. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes. O documento com a referência 10, que contém orientações no domínio da histopatologia, dá mais informações sobre a dissecação, a fixação, a colheita de amostras e a histopatologia de tecidos do sistema endócrino.
69. Devem examinar-se todas as lesões importantes. Para ajudar na elucidação dos NOAEL, devem ser examinados os órgãos-alvo para outros grupos de dose, em especial nos grupos que apresentem um pedido para indicar um NOAEL.
70. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais, deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos grupos expostos a uma dose do produto químico em estudo.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

71. Devem ser apresentar-se os dados individuais de cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de ensaio, o número de animais no início deste, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou eutanasiados por intervenção humana, a hora da morte de cada animal, a descrição e evolução temporal dos efeitos tóxicos, o número de animais férteis, o número de fêmeas prenhes, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados, incluindo o momento em que surgiram, a duração e a gravidade dos eventuais efeitos tóxicos, os tipos de alterações histopatológicas e quaisquer dados relevantes sobre a ninhada. No apêndice 3 figura um modelo de relatório sob a forma de tabela, que se revelou muito útil para a avaliação de efeitos na reprodução/no desenvolvimento.
72. Se possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por um método estatístico corrente adequado. Na comparação de um efeito numa gama de doses, deve evitar-se o recurso a testes t múltiplos. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos ao planear o estudo. A análise estatística da DAG e da retenção de mamilo deve basear-se em dados individuais das crias, tendo em conta os efeitos da ninhada. Se for adequado, a ninhada é escolhida como unidade de análise. A análise estatística do peso corporal das crias deve basear-se em dados relativos a cada indivíduo, tendo em conta o tamanho da ninhada. Devido às dimensões limitadas do estudo, as análises estatísticas, sob a forma de ensaios de significância, têm um valor limitado para muitos parâmetros, em especial os parâmetros de reprodução. Alguns dos métodos mais utilizados, especialmente os ensaios paramétricos para medição da tendência central, são inadequados. Se se utilizarem análises estatísticas, o método escolhido deve adequar-se à distribuição da variável examinada, que deve ser selecionada antes do início do estudo.

Avaliação dos resultados

73. As conclusões do presente estudo de toxicidade devem ser ponderadas com base nos efeitos observados, na autópsia e nos resultados microscópicos. A análise deverá considerar a relação (ou a ausência desta) entre a dose do produto químico de ensaio e a presença ou ausência, incidência e gravidade das anomalias, incluindo lesões macroscópicas, órgãos identificados como alvos, infertilidade, alterações da reprodução e procriação, alterações do peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos.
74. Devido ao curto período de tratamento dos machos, a histopatologia dos testículos e dos epidídimos deve ser tida em conta juntamente com os dados de fertilidade, aquando da avaliação dos efeitos para a reprodução masculina. A utilização de dados históricos de controlo sobre a reprodução/o desenvolvimento (por exemplo, para as dimensões da ninhada, a DAG, a retenção de mamilo, os níveis séricos de T4), se disponíveis, pode também ser útil para auxiliar a interpretação do estudo.
75. Para fins de controlo de qualidade, propõe-se a compilação de dados de controlo históricos e o cálculo de coeficientes de variação dos dados numéricos, especialmente no caso dos parâmetros relacionados com a deteção de perturbadores do sistema endócrino. Estes dados podem ser utilizados para fins comparativos na avaliação de estudos reais.

Relatório de ensaio

76. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida
- estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Veículo (se adequado):

- justificação da escolha do veículo, se não for água.

Animais utilizados no ensaio:

- espécie e estirpe utilizadas;
- número, idade e sexo dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;
- peso individual dos animais no início do ensaio

- caso não sejam utilizados ratazanas, justificação do recurso a outra espécie.

Condições de realização do ensaio:

- fundamentação da escolha das doses;
- elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta dos animais; concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;
- elementos relativos à administração do produto químico em estudo;
- se pertinente, equivalência entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber, expressa em ppm, e a dose real, expressa em mg/kg de peso corporal/dia,
- elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada do processo de aleatorização para selecionar as crias para abate, se este for seletivo.

Resultados:

- peso corporal e suas alterações;
- consumo de alimentos e de água, se pertinente,
- reações tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente na fertilidade, na gestação e outros sinais de toxicidade;
- duração da gestação;
- efeitos nocivos, ou outros, na reprodução, na descendência, no crescimento pós-natal, etc.;
- natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis),
- avaliações da atividade sensorial, da força de preensão e da atividade motora;
- análises hematológicas com valores de base relevantes;
- análises bioquímicas com valores de base relevantes;
- número de fêmeas adultas com ciclo éstrico normal ou anormal, e duração do ciclo;
- número de nados-vivos e de perdas pós-implantação;
- número de crias com anomalias macroscópicas visíveis, avaliação bruta dos órgãos genitais externos, número de crias são significativamente menores do que as crias de controlo correspondentes;
- momento do óbito durante o estudo, ou indicação de que os animais sobreviveram até ao final do mesmo;

- número de implantações, dimensão da ninhada e pesos da ninhada no momento do registo;
- dados relativos à massa corporal das crias;
- DAG de todas as crias (e peso corporal no dia da medição da DAG);
- retenção de mamilo em crias do sexo masculino,
- níveis das hormonas da tiroide no dia 13, para as crias e os machos adultos (bem como para as mães e as crias no dia 4, caso tenham sido medidos)
- peso corporal no momento do abate e peso dos órgãos dos animais progenitores;
- resultados das autópsias;
- descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos;
- dados de absorção (se disponíveis);
- tratamento estatístico dos resultados, se for o caso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

Interpretação dos resultados

77. O estudo proporciona avaliações da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento associada à administração de doses repetidas. Uma vez que o estudo incide tanto nos parâmetros de toxicidade geral como de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento, os resultados obtidos permitem estabelecer uma distinção entre os efeitos para a reprodução/o desenvolvimento não associados a uma toxicidade geral e os efeitos nocivos apenas induzidos a níveis igualmente tóxicos para os progenitores (ver pontos 7-11). Pode fornecer uma indicação da necessidade de realizar mais estudos, bem como orientações para a conceção de estudos subsequentes. Para a interpretação dos resultados sobre a reprodução e o desenvolvimento, deve consultar-se o documento de orientações 43 da OCDE (19). O documento de orientação 106 da OCDE sobre a avaliação histológica dos ensaios endócrinos e de reprodução em roedores (16) fornece informações sobre a preparação e a avaliação de órgãos (endócrinos) e de esfregaços vaginais que podem ser úteis para a presente *Test Guideline*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponível mediante pedido junto da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris
- (2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponível mediante pedido junto da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris
- (3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol, Sci.*, 19, 141-149.
- (4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89-95.

- (5) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (6) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599-609.
- (14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (15) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (17) Hess RA e Moore B.J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- (18) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (19) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES (VER TAMBÉM O DOCUMENTO GD 150 DA OCDE) (29)

Atividade anfrogénica capacidade de um produto químico de agir como uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona) num mamífero.

Atividade antiandrogénica capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona androgénica natural (por exemplo a testosterona) num mamífero.

Atividade antiestrogénica capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona estrogénica natural (por exemplo, o 17 β -estradiol) num mamífero.

Atividade antitiroideia capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T₃) num mamífero.

Atividade estrogénica capacidade de um produto químico de agir como hormona estrogénica natural (por exemplo o 17 β -estradiol) num mamífero.

Atividade tiroideia capacidade de um produto químico de agir como uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T₃) num mamífero.

Diminuição da fertilidade reflete perturbações de funções ou capacidades reprodutoras masculinas ou femininas.

Dosagem termo geral que inclui a dose, a sua frequência e a duração da aplicação da dose.

Dose quantidade de produto químico em estudo administrada. Exprime-se em peso diário do produto químico em estudo por unidade de peso corporal do animal de ensaio (por exemplo mg/kg de peso corporal/dia) ou sob a forma de uma concentração constante nos alimentos.

NOAEL abreviatura de «*No Observed Adverse Effect Level*» («nível sem observação de efeitos nocivos»), que constitui a dose máxima que não produz efeitos nocivos observáveis da exposição à mesma.

Produto químico uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Toxicidade evidente termo geral que descreve a existência de sinais claros de toxicidade após a administração do produto químico em estudo. Os sinais em causa devem ser suficientes para a avaliação dos perigos e devem ser tais que seja de prever que o aumento da dose administrada provoque o aparecimento de sinais intensos de toxicidade e provável mortalidade.

Toxicidade materna efeitos nocivos nas fêmeas prenhes, que se apresentam especificamente (efeito direto) ou não especificamente (efeito indireto) e estão relacionados com a gestação.

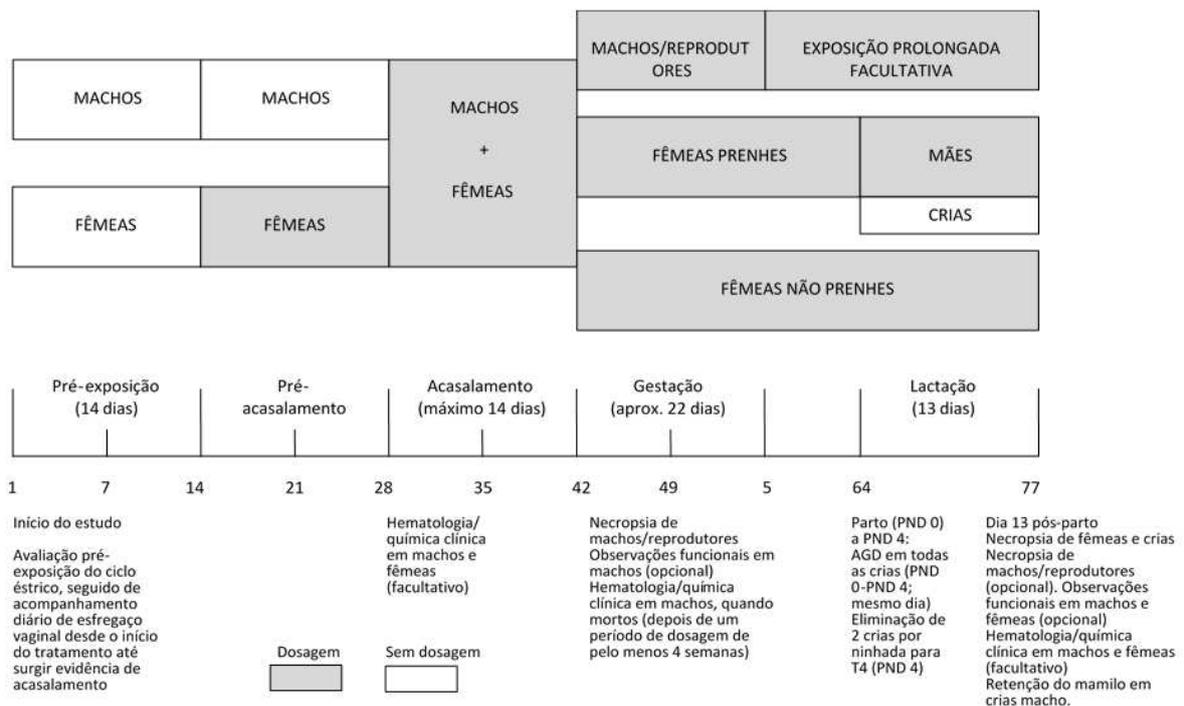
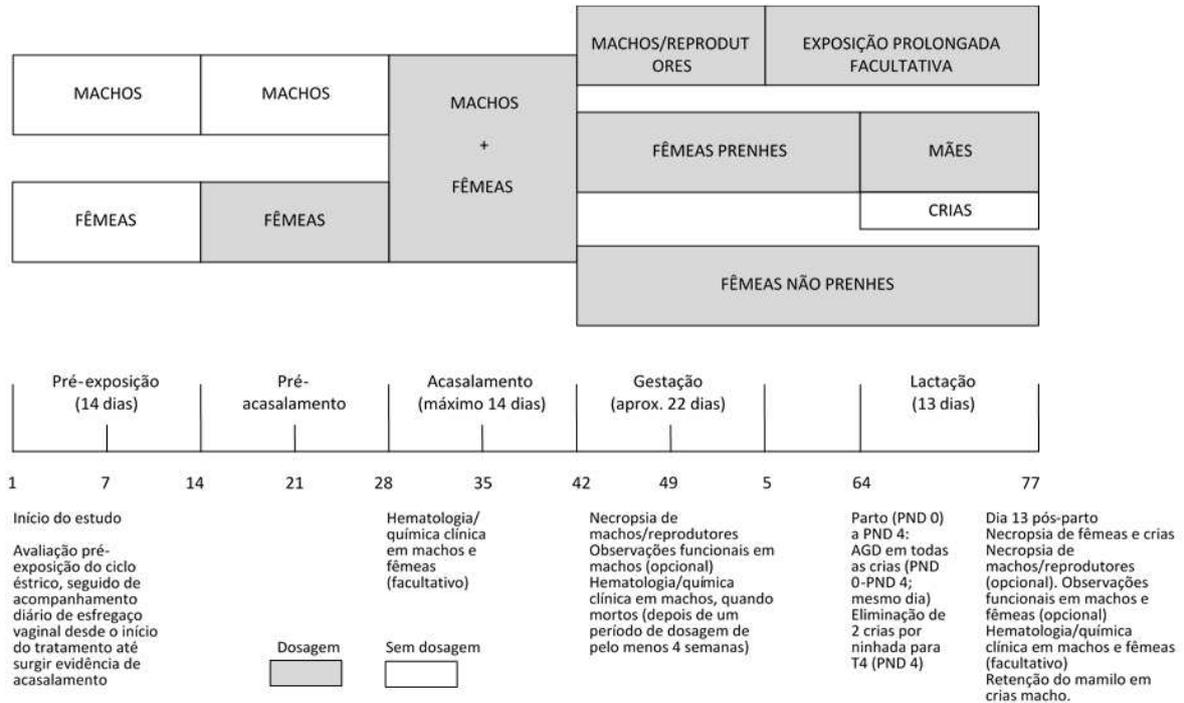
Toxicidade para a reprodução designa efeitos prejudiciais na descendência e/ou perturbações de funções ou capacidades reprodutoras masculinas ou femininas.

Toxicidade para o desenvolvimento a manifestação de toxicidade reprodutiva, sob a forma de perturbações estruturais pré-natal, peri-natal e pós-natal ou perturbações funcionais nos descendentes.

Validação processo científico concebido para caracterizar as limitações e os imperativos operacionais de um método de ensaio e demonstrar a fiabilidade e pertinência do mesmo para um determinado fim.

Apêndice 2

DIAGRAMA DO CALENDÁRIO EXPERIMENTAL, COM INDICAÇÃO DA DURAÇÃO MÁXIMA DO ESTUDO, COM BASE NUM PERÍODO TOTAL DE ACASALAMENTO DE 14 DIAS



Apêndice 3

RELATÓRIO DE SÍNTESE SOBRE OS EFEITOS NA REPRODUÇÃO/NO DESENVOLVIMENTO

OBSERVAÇÕES	VALORES				
	0 (controlo)
Dosagem (unidades).....					
Pares iniciais (N)					
Ciclo éstrico (pelo menos, o comprimento médio e a frequência de ciclos irregulares)					
Fêmeas que apresentam indícios de copulação (N)					
Fêmeas que engravidaram (N)					
Conceção nos dias 1-5 (N)					
Conceção nos dias 6 -... ⁽¹⁾ (N)					
Gestação ≤ 21 dias (N)					
Gestação = 22 dias (N)					
Gravidez ≥ 23 dias (N)					
Mães com nados-vivos (N)					
Mães com nados-vivos no dia 4 pp (N)					
Implantes/mãe (média)					
Crias vivas/mãe à nascença (média)					
Crias vivas/mãe no dia 4 (média)					
Rácio sexual (m/f) à nascença (média)					
Rácio sexual (m/f), no dia 4 (média)					
Peso da ninhada à nascença (média)					
Peso da ninhada no dia 4 (média)					
Peso da cria à nascença (média)					
Peso da cria no momento da medição da DAG (média dos machos, média das fêmeas).					
DAG da cria no mesmo dia pós-natal, dia 4 após o nascimento (média dos machos, média das fêmeas, nota PND)					

OBSERVAÇÕES	VALORES				
Peso das crias no dia 4 (média)					
Peso das crias no dia 13 (média)					
Retenção de mamilo das crias do sexo masculino no dia 13 (média)					
CRIAS ANORMAIS					
Mães com 0					
Mães com 1					
Mães com ≥ 2 duas crias					
PERDA DE CRIAS					
Pré-natal (implantações menos nados-vivos)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					
Pós-natal (nados-vivos menos vivos no dia 13 pós-natal)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					
(1) Último dia do período de acasalamento					

B.65 MÉTODO DE ENSAIO IN VITRO DE MEMBRANA DE ESTANQUIDADE PARA A CORROSÃO CUTÂNEA

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 435 da OCDE (2015). Entende-se por corrosão da pele a produção de danos irreversíveis nos tecidos cutâneos, que se manifestam na forma de necrose visível em toda a epiderme e atingindo a derme, por aplicação de um produto químico em estudo, definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e pelo Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) (1). Trata-se de um método de membrana de estanquidade *in vitro* que pode ser utilizado para identificar produtos químicos corrosivos. Utiliza uma membrana artificial concebida para reagir a produtos químicos corrosivos de forma similar à pele animal *in situ*.
2. A corrosividade cutânea tem sido tradicionalmente avaliada pela aplicação do produto químico em estudo à pele de animais vivos, seguida da avaliação dos danos causados aos tecidos após um determinado período (2). Além do presente, foi adotada uma série de outros métodos de ensaio *in vitro* alternativos (3)(4) ao procedimento normalizado da pele de coelho *in vivo* (capítulo B.4 do presente anexo, equivalente à *Test Guideline* 404 da OCDE), para identificar produtos químicos corrosivos (2). A estratégia de ensaio sequencial por etapas do GHS da ONU e o documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA) para a corrosão e irritação da pele recomendam o uso de métodos de ensaio *in vitro* validados e aceites nos módulos 3 e 4 (1) (5). A IATA descreve vários módulos que contêm fontes de informação e ferramentas de análise: (i) fornece orientações sobre como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não provenientes de ensaios para a avaliação dos potenciais de irritação cutânea e de corrosão cutânea dos produtos químicos e (ii) propõe uma abordagem em caso de necessidade de ensaios complementares, mesmo quando se obtêm resultados negativos (5). Nesta abordagem modular, os resultados positivos dos métodos de ensaio *in vitro* podem ser utilizados para classificar um produto químico como corrosivo, sem a necessidade de experimentação animal, reduzindo e tornando mais seletiva a utilização de animais em ensaios e evitando a dor e o sofrimento que podem ocorrer quando são usados animais para esta finalidade.
3. Foram realizados estudos de validação do modelo *in vitro* de membrana de estanquidade disponível comercialmente com a denominação Corrositex[®] (6) (7) (8), estudos esses que apresentaram uma exatidão global de previsão de corrosividade cutânea de 79 % (128/163), uma sensibilidade de 85 % (76/89) e uma especificidade de 70 % (52/74) para 163 substâncias e misturas constantes de uma base de dados (7). Atendendo à sua validade reconhecida, este método de referência validado (MRV) foi recomendado para utilização no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial destinada a avaliar o potencial de corrosão dérmica de produtos químicos (5) (7). Antes de se poder utilizar um método proposto de ensaio *in vitro* da membrana de estanquidade para a corrosão cutânea para efeitos normativos, é necessário determinar a sua fiabilidade e adequação (precisão), bem como os limites da utilização proposta, para garantir a similaridade com o MRV (9), de acordo com os requisitos das normas de desempenho (10). A aceitação mútua de dados da OCDE só será garantida após a revisão e inclusão de qualquer método novo ou atualizado proposto na sequência das substâncias prioritárias, para inclusão nas diretrizes de ensaio correspondentes da OCDE. Atualmente, apenas um método *in vitro* é abrangido pela *Test Guideline* 435 da OCDE (o presente método de ensaio, que utiliza o já referido modelo Corrositex[®]).
4. Outros métodos de ensaio para determinação da corrosividade cutânea baseiam-se no uso de pele humana reconstruída (TG 431 OCDE) (3) e em pele de ratazana isolada (TG 430 da OCDE) (4). A mesma diretriz prevê a subcategorização dos produtos químicos corrosivos nas três subcategorias de corrosividade do sistema GHS da ONU e nos três grupos de embalagem da ONU para o risco de corrosividade. Esta *Test Guideline* foi adotada em 2006 e atualizada em 2015, para ter em conta o documento de orientação da IATA e para atualizar a lista de substâncias de referência.

DEFINIÇÕES

5. As definições utilizadas constam do apêndice.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

6. O ensaio descrito no presente método permite a identificação de produtos químicos corrosivos, bem como a subcategorização de produtos químicos em estudo corrosivos de acordo com o GHS/CRE (quadro 1). Além disso, pode ser usado para fundamentar decisões sobre a corrosividade e a não corrosividade de determinadas classes de produtos químicos, por exemplo, ácidos orgânicos e inorgânicos, derivados de ácidos (2) e bases para fins de ensaio (7)(11)(12). Descreve um procedimento genérico semelhante ao método de ensaio de referência validado (7). Embora o presente método não forneça informações adequadas sobre a irritação da pele, deve notar-se que o método de

(1) 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).

(2) «Derivado de ácido» é uma denominação de classe não específica, designando, de forma genérica, um ácido produzido a partir de um produto químico, quer diretamente, quer por modificação ou substituição parcial. Esta classe inclui anidridos, ácidos haloacéticos, sais e outros tipos de produtos químicos.

ensaio B.46 (equivalente à *Test Guideline 439* da OCDE) incide especificamente no efeito de irritação cutânea da pele *in vitro* (13). Para uma avaliação exaustiva dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica, deve consultar-se o documento de orientação da OCDE relativo a abordagens integradas de ensaio e avaliação (5).

Quadro 1

Categoria e subcategorias de corrosividade cutânea do sistema GHS da ONU ⁽¹⁾

Categoria de corrosividade (categoria 1) (para entidades que não utilizam subcategorias)	Subcategorias de corrosividade potencial ⁽¹⁾ (para entidades que utilizam subcategorias, incluindo o Regulamento CRE)	Corrosivo em ≥ 1 de 3 animais	
		Exposição	Observação
Corrosivo	Subcategoria de corrosividade 1A	≤ 3 minutos	≤ 1 hora
	Subcategoria de corrosividade 1B	> 3 minutos/ ≤ 1 hora	≤ 14 dias
	Subcategoria de corrosividade 1C	> 1 hora/ ≤ 4 horas	≤ 14 dias

⁽¹⁾ Na UE, o Regulamento CRE aplica as três subcategorias de corrosão cutânea — 1A, 1B e 1C.

7. Uma limitação do método de referência validado (7) reside em que muitos produtos químicos não corrosivos e alguns produtos químicos corrosivos podem não ser adequados para ensaio, com base nos resultados do ensaio de compatibilidade inicial (ver ponto 13). Muitas substâncias químicas aquosas com pH compreendido entre 4,5 e 8,5 não são adequadas para o ensaio; contudo, 85 % dos produtos químicos deste intervalo de pH estudados não se revelaram corrosivos em ensaios com animais (7). O método da membrana de estanquidade *in vitro* pode ser utilizado para estudar sólidos (solúveis ou insolúveis na água), líquidos (aquosos ou não aquosos) e emulsões. No entanto, os produtos químicos em estudo que não provocam uma alteração detetável no ensaio de compatibilidade (ou seja, uma mudança de cor no CDS do sistema de deteção do método de ensaio de referência validado) não podem ser ensaiados com o método da membrana de estanquidade, devendo-lhes ser aplicados outros métodos de ensaio.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

8. O sistema do ensaio tem dois componentes: uma barreira macromolecular sintética e um sistema de deteção de produtos químicos (CDS); o método deteta, através da barreira da membrana CDS, os danos causados por produtos químicos em estudo corrosivos após a aplicação do produto em causa na superfície da barreira da membrana macromolecular sintética (7), provavelmente pelo(s) mesmo(s) mecanismo(s) de corrosão que age(m) na pele viva.
9. A penetração da barreira da membrana (ou rutura) pode ser medida por um conjunto de procedimentos ou CDS, incluindo a alteração da cor de um indicador de pH ou de qualquer outra propriedade da solução do indicador sob a barreira.
10. A barreira da membrana deve ser avaliada para ser válida, ou seja, adequada e fiável para o uso pretendido. Contudo, é necessário garantir que as diferentes preparações são compatíveis com as propriedades da barreira, por exemplo, que são capazes de constituir uma barreira a produtos químicos corrosivos e de permitir classificar as propriedades dos produtos químicos corrosivos nas várias subcategorias de corrosividade do GHS da ONU (1). A classificação atribuída baseia-se no tempo que o produto demora a penetrar na membrana até atingir a solução do indicador.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

11. Antes de utilizarem de forma rotineira o método da barreira de membrana *in vitro* em conformidade com o presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, classificando corretamente as doze substâncias recomendadas no quadro 2. No caso de uma substância incluída na lista estar indisponível ou sempre que se justifique, pode ser utilizada outra substância para a qual estejam disponíveis dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro* (por exemplo, da lista de produtos químicos de referência (10)), desde que sejam aplicados os critérios de seleção descritos no quadro 1.

Quadro 2

Substâncias para a demonstração de competência ⁽¹⁾

Substância ⁽²⁾	N.º CAS	Classe química	Subcategoria <i>in vivo</i> do sistema GHS da ONU ⁽³⁾	Subcategoria <i>in vitro</i> do sistema GHS da ONU ⁽³⁾
Trifluoreto de boro di-hidratado	13319-75-0	Ácido inorgânico	1A	1A
Ácido nítrico	7697-37-2	Ácido inorgânico	1A	1A
Pentacloro de fósforo	10026-13-8	Precursor de ácido inorgânico	1A	1A
Cloreto de valerilo	638-29-9	Cloreto de acilo	1B	1B
Hidróxido de sódio	1310-73-2	Base inorgânica	1B	1B
1-(2-Aminoetil)piperazina	140-31-8	Amina alifática	1B	1B
Cloreto de benzenossulfonilo	98-09-9	Cloreto de acilo	1 C	1 C
N,N-Dimetilbenzilamina	103-83-3	Anilina	1 C	1 C
Tetraetilenopentamina	112-57-2	Amina alifática	1 C	1 C
Eugenol	97-53-0	Fenol	NC	NC
Acrilato de nonilo	2664-55-3	Acrilato/metacrilato	NC	NC
Bicarbonato de sódio	144-55-8	Sal inorgânico	NC	NC

⁽¹⁾ As doze substâncias acima enumeradas incluem três substâncias de cada uma das três subcategorias GHS da ONU para substâncias corrosivas e três substâncias não corrosivas, estão facilmente disponíveis em fornecedores comerciais, e a subcategoria GHS da ONU baseia-se em resultados de ensaios *in vivo* de alta qualidade. Estas substâncias são retiradas da lista de 40 substâncias de referência incluídas na lista mínima de produtos químicos identificados para demonstrar a exatidão e a fiabilidade de métodos de ensaio estrutural e funcionalmente semelhantes ao método de ensaio de referência validado; foram selecionadas a partir das 163 substâncias químicas de referência originalmente utilizadas para validar o método de ensaio de referência (Corrositex[®]) (7) (10) (14). O objetivo deste processo de seleção foi incluir, tanto quanto possível, produtos químicos que: sejam representativos da gama de respostas de corrosividade (p. ex., não corrosivo; corrosivos dos grupos de embalagem I, II e III, da ONU) cujo método de ensaio de referência validado possa medir ou prever; sejam representativos das classes de produtos químicos utilizados no processo de validação; tenham estruturas químicas bem definidas; produzam resultados reprodutíveis no método de ensaio de referência validado; produzam resultados definitivos no método de ensaio de referência *in vivo*; estejam comercialmente disponíveis e não tenham custos de eliminação proibitivos (14).

⁽²⁾ Substâncias ensaiadas puras ou com $\geq 90\%$ de pureza.

⁽³⁾ Os grupos de embalagem da ONU correspondentes são os grupos I, II e III, respetivamente, para as subcategorias 1A, 1B e 1C do sistema GHS da ONU. NC = Não corrosivo.

PROCEDIMENTO

- Os pontos seguintes descrevem os componentes e os procedimentos de um método de ensaio de membrana de estanquidade artificial, para avaliação da corrosão (7)(15), com base no MRV, designadamente o MRV Corrositex[®] disponível no comércio. A membrana de estanquidade e o indicador de compatibilidade, bem como as soluções de categorização podem ser construídos, elaborados ou obtidos comercialmente, como é o caso do MRV Corrositex[®]. Existe uma amostra do protocolo do método de ensaio para o método de ensaio de referência validado (7). Os ensaios devem ser realizados à temperatura ambiente (17-25 °C) e os componentes devem cumprir as condições que se descrevem de seguida.

Ensaio de compatibilidade do produto químico em estudo

- Antes da realização do ensaio de membrana de estanquidade, efetua-se um ensaio de compatibilidade para determinar se o produto químico em estudo é detetável pelo CDS. Se o CDS não detetar o produto em causa, o método de ensaio de membrana de estanquidade não é adequado para avaliar a potencial corrosividade desse produto, devendo utilizar-se outro método de ensaio. O CDS e as condições de exposição utilizadas para o ensaio de compatibilidade devem refletir a exposição no ensaio de membrana de estanquidade subsequente.

Ensaio de classificação dos produtos químicos em estudo em função do tempo

14. Se for adequado no contexto do método de ensaio, um produto químico em estudo que tenha sido qualificado pelo teste de compatibilidade deve ser sujeito a um ensaio de classificação em função do tempo (ensaio de rastreio para distinguir os ácidos ou bases fracos dos fortes). Por exemplo, no método de referência validado, utiliza-se um ensaio de classificação em função do tempo para indicar qual de dois períodos se deve utilizar para a deteção de um potencial de acidez ou alcalinidade significativo. Devem utilizar-se dois períodos diferentes para determinar a corrosividade para a pele e a respetiva subcategoria no sistema GHS da ONU, com base no potencial de acidez ou alcalinidade do produto químico em estudo.

COMPONENTES DO MÉTODO DE ENSAIO DE MEMBRANA DE ESTANQUIDADE

Membrana de estanquidade

15. A membrana de estanquidade tem dois componentes: um gel aquoso macromolecular proteico e uma membrana permeável de apoio. O gel proteico deve ser impermeável a líquidos e sólidos, mas pode ser corroído e tornar-se permeável. A membrana de estanquidade deve ser armazenada inteira, em condições previamente determinadas e que impeçam a deterioração do gel, por exemplo, por secagem, crescimento microbiano, deslocação, fendas, para que o seu desempenho não seja afetado. Deve determinar-se o período de armazenagem aceitável, não devendo as preparações da membrana de estanquidade ser utilizadas após esse período.
16. A membrana de apoio permeável confere apoio mecânico ao gel proteico durante o processo de gelificação e de exposição ao produto químico em estudo. Deve impedir o amolecimento ou a deslocação do gel e ser facilmente permeável a todos os produtos químicos em estudo.
17. O gel proteico, constituído, por exemplo, por queratina, colagénio ou misturas de proteínas que formam uma matriz de gel serve de alvo para o produto químico em estudo. A matéria proteica é colocada sobre a superfície da membrana de apoio, onde gelifica antes de a membrana de estanquidade ser colocada sobre a solução do indicador. O gel proteico deve manter sempre a mesma espessura e densidade e não exibir bolhas de ar ou defeitos que possam afetar a sua integridade funcional.

Sistema de deteção química (CDS)

18. A solução do indicador, que é a mesma utilizada para o ensaio de compatibilidade, deve reagir à presença do produto químico em estudo. Deve utilizar-se um indicador de pH corante ou com uma combinação de corantes – por exemplo, vermelho de cresol e alaranjado de metilo – que mude de cor devido à presença do produto químico. O sistema de medição pode ser visual ou eletrónico.
19. Os sistemas de deteção desenvolvidos para detetar a passagem do produto químico em estudo através da membrana de estanquidade devem ser avaliados quanto à sua adequação e fiabilidade, a fim de definir a gama de produtos químicos que podem ser detetados e os limites quantitativos de deteção.

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Montagem dos componentes do método de ensaio

20. A membrana é colocada num frasco (ou tubo) que contém a solução do indicador, de modo a que a membrana de apoio esteja totalmente em contacto com a solução do indicador e que não se observem bolhas de ar. Deve ter-se o cuidado de assegurar a integridade da membrana.

Aplicação do produto químico em estudo

21. É cuidadosamente espalhada e uniformemente distribuída pela superfície superior da membrana uma quantidade adequada do produto químico em estudo, como, por exemplo, 500 µl de um líquido ou 500 mg de um sólido finamente pulverizado (7). Prepara-se para cada substância, e para os despectivos controlos, um número adequado de replicados – por exemplo, quatro (7) (ver pontos 23 a 25). Regista-se o momento da aplicação do produto químico em estudo à membrana. Para assegurar o registo exato dos tempos de corrosão curtos, procede-se ao escalonamento dos tempos de aplicação do produto químico nos frascos replicados.

Medição das penetrações na membrana

22. Cada frasco é adequadamente monitorizado e é registado o momento da primeira mudança na solução do indicador, ou seja, a penetração da membrana, determinando-se o tempo decorrido entre a aplicação e a penetração da membrana.

Controlos

23. Nos ensaios que utilizem um veículo ou solvente com o produto químico de estudo, o veículo ou solvente deve ser compatível com o sistema da membrana de estanquidade, ou seja, não deve alterar a integridade sistema da membrana nem a corrosividade do produto químico. Se for caso disso, o controlo do solvente (ou do veículo) deve ser ensaiado em simultâneo com o produto químico em estudo, a fim de demonstrar a compatibilidade do solvente com o sistema de membrana.
24. Deve ensaiar-se em simultâneo com o produto químico em estudo um controlo positivo (corrosivo) com corrosividade intermédia – por exemplo, atividade de 110 ± 15 mg de hidróxido de sódio (subcategoria de corrosividade 1B do GHS da ONU) (7) –, para avaliar se o sistema está a funcionar de forma aceitável. Um segundo controlo positivo com a mesma classe química do produto químico em estudo pode ser útil para avaliar o potencial de corrosividade relativo de um produto químico corrosivo. Devem selecionar-se controlo(s) positivo(s) de corrosividade intermédia (por exemplo, da subcategoria 1B do GHS da ONU), a fim de detetar mudanças no tempo de penetração, que pode ser inaceitavelmente maior ou menor do que o valor de referência estabelecido, indicando assim que o sistema de teste não funciona corretamente. Para o efeito, os produtos químicos extremamente corrosivos (subcategoria 1A do sistema GHS da ONU) ou não corrosivos são de utilidade limitada. Um produto químico corrosivo da subcategoria 1B do sistema GHS da ONU permitirá detetar um período demasiado rápido ou demasiado lento. Uma substância fracamente corrosiva (subcategoria 1C do sistema GHS da ONU) pode ser utilizada como controlo positivo, com vista a medir a capacidade do método de ensaio para estabelecer uma distinção sistemática entre substâncias químicas fracamente corrosivas e não corrosivas. Independentemente da abordagem utilizada, deve definir-se uma gama aceitável de respostas ao controlo positivo com base na gama histórica de momentos de avanço para o(s) controlo(s) positivo(s) utilizado(s), como, por exemplo, os desvios-padrão médios 2-3. Em cada estudo, deve determinar-se o tempo de penetração exato para o controlo positivo, para que possam ser detetados desvios fora da gama aceitável.
25. Um controlo negativo (não corrosivo) – por exemplo, 10 % de ácido cítrico e 6 % de ácido propiónico (7) – também devem ser ensaiados simultaneamente com o produto químico em estudo, constituindo outra medida de controlo de qualidade para demonstrar a integridade funcional da membrana.

Critérios de aceitabilidade do estudo

26. Atendendo aos parâmetros temporais estabelecidos para cada subcategoria de corrosividade do sistema GHS da ONU, o tempo (em minutos) decorrido entre a aplicação do produto químico em estudo na membrana e a penetração nesta é utilizado para prever a corrosividade do produto em causa. Para que um estudo possa ser considerado aceitável, o controlo positivo paralelo deve produzir o tempo de penetração esperado (por exemplo, 8-16 min até atingir o hidróxido de sódio, se usado como controlo positivo); o controlo negativo simultâneo não deve ser corrosivo. Se for utilizado, o controlo de solvente simultâneo não deve ser corrosivo nem deve alterar a corrosividade potencial do produto químico. Antes de utilizarem um método de ensaio de rotina conforme com o presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica utilizando as doze substâncias recomendadas no quadro 2. No caso dos novos métodos «me-too», desenvolvidos no âmbito deste método de ensaio, que são estruturalmente semelhantes ao método de referência validado (14), deve recorrer-se às normas de desempenho predefinidas para demonstrar a fiabilidade e a exatidão de um novo método antes de ser utilizado para ensaios regulamentares (10).

Interpretação dos resultados e classificação das substâncias químicas em estudo

27. Utiliza-se o tempo (em minutos) decorrido entre a aplicação do produto químico em estudo na membrana e a penetração nesta para classificar o produto em causa em termos das subcategorias de corrosividade do sistema GHS da ONU (1) e, se for caso disso, do grupo de embalagens da ONU (16). Para cada método de ensaio proposto, são estabelecidos valores-limite para cada uma das três subcategorias. As decisões finais sobre tempos-limite devem ter em conta a necessidade de minimizar a subclassificação do perigo de corrosão (ou seja, os falsos negativos). No presente ensaio, devem utilizar-se os tempos-limite do Corrositex[®], descritos no quadro 3, uma vez que este constitui o único método de ensaio atualmente abrangido pela *Test Guideline* em vigor (7).

Quadro 3

Modelo de previsão do Corrositex®

Tempo médio de penetração (min)		Previsão do GHS da ONU ⁽³⁾
Produtos químicos em estudo da categoria ⁽¹⁾ (determinados pelo ensaio de classificação do método)	Produtos químicos em estudo da categoria ⁽²⁾ (determinados pelo método de classificação do método)	
0-3 min	0-3 min	Subcategoria facultativa de corrosividade 1A
> 3-60 min	> 3-30 min	Subcategoria facultativa de corrosividade 1B
> 60-240 min	> 30-60 min	Subcategoria facultativa de corrosividade 1C
> 240 min	> 60 min	Não corrosivo

⁽¹⁾ Produtos químicos em estudo com reserva ácida/alcalina elevada (6).

⁽²⁾ Produtos químicos em estudo com uma reserva ácida/alcalina baixa (6).

⁽³⁾ As subcategorias 1A, 1B e 1C do GHS da ONU correspondem aos grupos de embalagem I, II e III.

DADOS E RELATÓRIOS**Dados**

28. O tempo (em minutos) decorrido entre a aplicação e a penetração da barreira pelo produto químico em estudo e pelo(s) controlo(s) positivo(s) deve ser indicado num quadro que inclua os dados correspondentes a cada replicado, bem como o desvio-padrão aproximado para cada ensaio.

Relatório de ensaio

29. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo e substâncias de controlo:

- Substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;
- Substância multicomponentes, UVCB e mistura: caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes;
- Aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- Proveniência, número do lote, se disponíveis;
- Tratamento do produto químico em estudo/substância de controlo antes do ensaio, se for o caso;
- Estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas.
- Condições de armazenagem.

Veículo:

- Identificação, concentração (se pertinente), volume utilizado;
- Justificação do excipiente escolhido.

Modelo de membrana de estanquidade in vitro e protocolo utilizado, incluindo a exatidão e fiabilidade demonstradas

Condições de realização do ensaio:

- Descrição da montagem e dos processos de preparação utilizados;
- Origem e composição da membrana de estanquidade *in vitro*;
- Composição e propriedades da solução do indicador;
- Método de deteção;
- Quantidades do produto químico em estudo e da substância de controlo;
- Número de replicados;
- Descrição e justificação do ensaio de classificação temporal realizado;
- Método de aplicação;
- Tempos de observação;
- Descrição dos critérios de avaliação e de classificação aplicados;
- Demonstração da competência na execução do método de ensaio antes da sua utilização regular, através do ensaio das substâncias químicas de demonstração de competência técnica.

Resultados:

- Quadro com os dados brutos obtidos a partir de amostras individuais de ensaio e de controlo, para cada replicado;
- Descrição de outros efeitos observados;
- Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os critérios de decisão utilizados.

*Discussão dos resultados**Conclusões***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1) Nações Unidas (ONU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»
- (3) Capítulo B.40.A deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Método de ensaio da epiderme humana reconstruída (RHE)».

- (4) Capítulo B.40 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)».
- (5) OCDE (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicology In Vitro* 12, 483-524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex[®]. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex[®] System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. *Alternative Methods in Toxicology* 10, 37-45.
- (9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).
- (10) OCDE (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.
- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX[®] Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. *ATLA* 29, 96-97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Capítulo B.46 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Método de ensaio em epiderme humana reconstruída». ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponível em: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Nações Unidas (ONU) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Apêndice

DEFINIÇÕES

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

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 muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de produtos químicos testados que são corretamente classificados como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência do produto químico em estudo positivo no tipo de produto químico em estudo (9).

Corrosão da pele *in vivo*: Produção de danos irreversíveis à pele, nomeadamente a necrose visível da epiderme, prolongando-se para a derme, após a aplicação de um produto químico em estudo durante um máximo de quatro horas. São exemplos típicos de reações corrosivas as úlceras, hemorragias e escaras sanguinolentas e, no final do período de observação de 14 dias, a descoloração, devido à perda de pigmentação da pele, e a formação de zonas de alopecia total e de cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser elucidadas por métodos histopatológicos.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de 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 em causa (9).

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).

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

GHS(Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos): Sistema 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 correspondentes elementos de comunicação, 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).

IATA: Abordagem integrada de ensaio e avaliação.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

NC: Não corrosivo.

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. Incluem: (i) componentes essenciais do método de ensaio; (ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (iii) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (9).

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico de ensaio: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

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

Sistema de deteção química (CDS): Sistema de medição visual ou eletrónico com uma solução indicadora que reage à presença de um produto químico em estudo, por exemplo, com a alteração do corante, ou combinação de corantes, do indicador de pH que mostre uma alteração da cor em reação à presença do produto químico em estudo ou com outros tipos de reações químicas ou eletroquímicas.

Substância: um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

B.66 ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO TRANSFETADA COM ESTABILIDADE PARA DETEÇÃO DE RECETORES DE ESTROGÉNIO AGONISTAS E ANTAGONISTAS E ANTAGONISTAS

INTRODUÇÃO GERAL

Método de ensaio baseado na *Test Guideline* da OCDE

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 455 (2016) da OCDE. Esta última é uma diretriz de ensaio baseada no desempenho (PBTG), que descreve a metodologia de ensaios de transativação transfetada *in vitro* para deteção de recetores de estrogénio agonistas e antagonistas (ensaios ER TA). É composto por vários métodos de ensaio, mecânica e funcionalmente afins, para a identificação de recetores de estrogénio (ER α e/ou ER β) agonistas e antagonistas, e deve facilitar o desenvolvimento de novos métodos de ensaio semelhantes ou modificados de acordo com os princípios de validação estabelecidos no *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1) da OCDE. Os métodos de ensaio de referência inteiramente validados (apêndice 2 e apêndice 3) que constituem a base deste PBTG são os seguintes:
 - The Stably Transfected TA (STTA) assay (2) using the (h) ER α -HeLa-9903 cell line; and
 - The VM7Luc ER TA assay (3) using the VM7Luc4E2 cell line (1) which predominately expresses hER α with some contribution from hER β (4)(5).

Para o desenvolvimento e a validação de ensaios semelhantes para o mesmo parâmetro de risco, existem normas de desempenho (PS) (6) (7), que importa utilizar. Permitem a alteração atempada do PBTG 455, para que se possam acrescentar novos ensaios semelhantes a um PBTG atualizado. No entanto, só serão adicionados ensaios semelhantes após análise e aprovação pela OCDE do cumprimento das normas de desempenho. Os ensaios incluídos no método TG 455 podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as necessidades dos países membros da OCDE relativamente a resultados de ensaios de transativação de recetores de estrogénio, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados da OCDE.

Antecedentes e princípios dos ensaios incluídos no presente método

2. A OCDE iniciou em 1998 uma atividade altamente prioritária com o objetivo de rever as diretrizes em vigor para a pesquisa e o ensaio de produtos químicos com possíveis efeitos de perturbação endócrina, bem como elaborar novas diretrizes. O quadro concetual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos potencialmente perturbadores do sistema endócrino do sistema endócrino foi revisto em 2012. Os quadros concetuais original e revisto constam, como anexo, do *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* da OCDE (8). O quadro concetual contém cinco níveis, cada um dos quais corresponde a um nível diferente de complexidade biológica. O ensaio de transativação de ER (TA) descrito no presente método de ensaio é do nível 2, que abrange os ensaios *in vitro* que facultam dados sobre mecanismos/vias endócrinos selecionados. O método destina-se a ensaios de transativação (TA) *in vitro*, concebidos para identificar recetores de estrogénio (RE) agonistas e antagonistas.
3. A interação dos estrogénios com os RE pode afetar a transcrição de genes estrogénicos, que podem conduzir à indução ou inibição de processos celulares, incluindo os necessários para a proliferação celular, para o desenvolvimento fetal normal e para a função reprodutora (9) (10) (11). A perturbação de sistemas estrogénicos normais pode provocar efeitos nocivos no desenvolvimento normal (ontogénese), na saúde reprodutiva e na integridade do aparelho reprodutor.
4. Os ensaios de TA *in vitro* baseiam-se numa interação direta ou indireta das substâncias com um recetor específico que regula a transcrição de um produto de gene repórter. Estes ensaios foram amplamente utilizados para avaliar a expressão dos genes regulados por recetores nucleares específicos, como os ER (12) (13) (14) (15) (16). Foram propostos para deteção da transativação estrogénica regulada pelo ER (17) (18) (19). Há, pelo menos, dois grandes subtipos de RE nucleares, α e β , que são codificados por genes distintos. As proteínas respetivas têm funções biológicas diferentes, bem como distribuições de tecidos e afinidades com ligandos diferentes (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). O ER α nuclear determina a reação estrogénica clássica (27) (28) (29) (30), pelo que a maioria dos modelos atualmente em desenvolvimento para medir a ativação ou a inibição dos ER são específicos do ER α . Os ensaios são utilizados para identificar produtos químicos que ativem (ou inibam) o ER na sequência de ligações de ligandos, após os quais o complexo recetor-ligando se liga a elementos de resposta de ADN específicos e transativa um gene repórter, que provoca o aumento da expressão celular de um marcador proteico. Nestes ensaios podem ser

utilizadas diferentes respostas do repórter. Em sistemas à base de luciferase, a enzima luciferase transforma o substrato de luciferina num produto bioluminescente que pode ser medido quantitativamente com um luminómetro. Outros exemplos de repórteres comuns são a proteína fluorescente e o gene *lacZ*, que codificam a β -galactosidase, uma enzima que pode transformar o substrato incolor X-Gal (5-bromo-4-cloro-indolil-galactopiranosídeo azul) num produto quantificável com um espectrofotómetro. Estes repórteres podem ser avaliados de forma rápida e pouco onerosa com os conjuntos de ensaio existentes no mercado.

5. Os estudos de validação do STTA e dos ensaios VM7Luc demonstraram a sua adequação e fiabilidade para o fim a que se destinam (3) (4) (5) (30). As normas de desempenho para ensaios ER TA baseados na luminescência com linhas celulares mamárias constam do ICCVAM *Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Recetor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3). Estas normas de desempenho foram alteradas para serem aplicáveis tanto aos ensaios STTA como aos ensaios VM7Luc (2).
6. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice 1.

Âmbito e limitações relacionados com os ensaios de TA

7. Os ensaios são propostos para efeitos de rastreio e de definição de prioridades, mas podem também fornecer informações mecanísticas passíveis de serem utilizadas numa abordagem de ponderação da suficiência da prova. Centram-se na TA induzida por um produto químico que se liga ao ER num sistema *in vitro*. Assim, os resultados não devem ser extrapolados diretamente para o complexo de sinalização e regulação do sistema endócrino intacto *in vivo*.
8. A TA mediada pelos ER é considerada um dos principais mecanismos de desregulação endócrina, embora existam outros mecanismos através dos quais o ED pode ocorrer, incluindo (i) interações com outros recetores e sistemas enzimáticos no sistema endócrino, (ii) síntese das hormonas, (iii) ativação e/ou inativação metabólica de hormonas, (iv) distribuição de hormonas por tecidos-alvo e (v) eliminação de hormonas do organismo. Nenhum dos ensaios no âmbito do presente método aborda estes modos de ação.
9. O presente método de ensaio incide na capacidade dos produtos químicos de ativarem (ou seja, agirem como agonistas) e eliminarem (ou seja, agirem como antagonistas) a transcrição dependente do ER. Alguns produtos químicos podem, em função do tipo de células, apresentar atividades de agonista e antagonista, sendo conhecidos como moduladores seletivos de recetores de estrogénio (SERMS). Os produtos químicos que são negativos nestes ensaios podem ser avaliados num ensaio de ligação de ER antes de se concluir que não se ligam ao recetor. Além disso, os ensaios só são suscetíveis de informar sobre a atividade da molécula-mãe tendo em conta a limitada capacidade de metabolização dos sistemas de células *in vitro*. Considerando que, na validação, apenas foram utilizadas substâncias estremes, a aplicabilidade a misturas de ensaio não foi tida em conta. No entanto, o método é teoricamente aplicável ao ensaio de substâncias multicomponentes, UVCB e misturas. Antes da sua aplicação a uma substância multicomponentes, UVCB ou mistura para obter dados com uma finalidade normativa, deve ponderar-se se e, em caso afirmativo, por que razão o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.
10. Para efeitos informativos, o quadro 1 fornece os resultados do ensaio de agonistas para as 34 substâncias que foram ensaiadas com ambos os métodos de ensaio de referência plenamente validados descritos no presente. Destas substâncias, 26 são classificadas como ER agonistas e 8 negativas, com base em relatórios publicados, incluindo ensaios *in vitro* de ligação de ER e TA e/ou o ensaio uterotrófico (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). O quadro 2 fornece os resultados do ensaio de antagonistas relativos às 15 substâncias ensaiadas em ambos os métodos de ensaio de referência plenamente validados descritos no presente método de ensaio. Entre estas substâncias, 4 são classificadas como antagonistas ER definitivas/presumidas e 10 negativas, com base em relatórios publicados, incluindo os ensaios *in vitro* de ligação ER e TA (2) (3) (18) (31). Relativamente aos dados resumidos nos quadros 1 e 2, houve concordância total entre os dois métodos de ensaio de referência para as classificações de todas as substâncias, com exceção de uma (mifepristona) para o ensaio antagonista, e cada substância foi classificada corretamente como agonista/antagonista de ER ou negativa. Constam das normas de desempenho para o AETR (6) (7), apêndice 2 (quadros 1, 2 e 3), informações suplementares sobre este grupo de produtos químicos, assim como ensaios de produtos químicos adicionais no STTA e no VM7Luc ER TA realizados durante os estudos de validação.

Quadro 1
Panorâmica dos resultados de ensaios STTA e VM7Luc ER TA para substâncias ensaiadas em ambos os ensaios agonistas e classificadas como ER agonistas (POS) ou negativas (NEG)

	Substância	N.º CAS	Ensaio STTA (1)			Ensaio VM7Luc ER TA (2)		Fonte de dados para classificação (4)		
			ER TA Atividade	Valor PC ₁₀ (M)	Valor PC ₅₀ (6) (M)	Atividade ER TA	Valor EC ₅₀ (6), (3) (M)	Outros ER TAs (5)	ER Ligante	Uterotrófico
1	17β-Estradiol (4)	50-28-2	POS	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	POS	5,63 × 10 ⁻¹²	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-Estradiol (4)	57-91-0	POS	7,24 × 10 ⁻¹¹	6,44 × 10 ⁻¹⁰	POS	1,40 × 10 ⁻⁹	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-Etimilestradiol (4)	57-63-6	POS	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	POS	7,31 × 10 ⁻¹²	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-Trembolona	10161-33-8	POS	1,78 × 10 ⁻⁸	2,73 × 10 ⁻⁷	POS	4,20 × 10 ⁻⁸	POS (2/2)	NT	NT
5	19-Nortestosteron (4)	434-22-0	POS	9,64 × 10 ⁻⁹	2,71 × 10 ⁻⁷	POS	1,80 × 10 ⁻⁶	POS(4/4)	POS	POS
6	4-Curmilfenol (4)	599-64-4	POS	1,49 × 10 ⁻⁷	1,60 × 10 ⁻⁶	POS	3,20 × 10 ⁻⁷	POS(5/5)	POS	NT
7	4-terc-Octilfenol (4)	140-66-9	POS	1,85 × 10 ⁻⁹	7,37 × 10 ⁻⁸	POS	3,19 × 10 ⁻⁸	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenin (4)	520-36-5	POS	1,31 × 10 ⁻⁷	5,71 × 10 ⁻⁷	POS	1,60 × 10 ⁻⁶	POS(26/26)	POS	NT

	Substância	N.º CAS	Ensaio STTA (1)			Ensaio VM7Luc ER TA (2)		Fonte de dados para classificação (4)		
			ER TA Atividade	Valor PC ₁₀ (M)	Valor PC ₅₀ (6) (M)	Atividade ER TA	Valor EC ₅₀ (6), (7) (M)	Outros ER TAs (6)	ER Ligante	Uterotrófico
9	Atrazin (4)	1912-24-9	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (30/30)	NEG.	NT
10	Bisfenol A (4)	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	POS	$5,33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B (4)	77-40-7	POS	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	POS	$1,95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Ftalato de benzilo e butilo (4)	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$1,98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG.
13	Corticosteron (4)	50-22-6	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (6/6)	NEG.	NT
14	Cumesterol (4)	479-13-0	POS	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	POS	$1,32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzeín (4)	486-66-8	POS	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	POS	$7,95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Dietilstilbestero (4)	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POS	$3,34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Ftalato de di-n-butilo	84-74-2	POS	$4,09 \times 10^{-6}$	—	POS	$4,09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG.
18	Etilparabeno	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	(no PC ₅₀)	POS	$2,48 \times 10^{-5}$	POS	—	NT
19	Estron (4)	53-16-7	POS	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	POS	$2,34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genistéin (4)	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	POS	$2,71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS

	Substância	N.º CAS	Ensaio STTA (1)			Ensaio VM7Luc ER TA (2)		Fonte de dados para classificação (4)		
			ER TA Atividade	Valor PC ₁₀ (M)	Valor PC ₅₀ (b) (M)	Atividade ER TA	Valor EC ₅₀ (b), (2) (M)	Outros ER TAs (c)	ER Ligante	Uterotrófico
21	Haloperidol	52-86-8	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT
22	Campferol (4)	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POS	$3,99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Clordecon (4)	143-50-0	POS	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Cetoconazol	65277-42-1	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT
25	Linurão (4)	330-55-2	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (8/8)	NEG.	NT
26	meso-Hexesterol (4)	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Metiltestosteron (4)	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT
28	Morina	480-16-0	POS	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POS	$2,37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Noretinodrel (4)	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	p,p'-Metoxicloro (4)	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(no PC ₅₀) (b)	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital (4)	57-30-7	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT

	Substância	N.º CAS	Ensaio STTA (1)			Ensaio VM7Luc ER TA (2)		Fonte de dados para classificação (4)		
			ER TA Atividade	Valor PC ₁₀ (M)	Valor PC ₅₀ (6) (M)	Atividade ER TA	Valor EC ₅₀ (6), (7) (M)	Outros ER TAs (6)	ER Ligante	Uterotrófico
32	Reserpina	50-55-5	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (4/4)	NEG.	NT
33	Espironolacton (4)	52-01-7	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (4/4)	NEG.	NT
34	Testosterona	58-22-0	POS	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POS	$1,75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; M = molar; EC₅₀ = Concentração semimáxima eficaz de um produto químico em estudo; NEG = negativo; POS = positivo; NT = não ensaiado; PC₁₀ (e PC₅₀) = concentração em estudo em que a resposta é 10 % (ou 50 % para PC₅₀) da resposta induzida pelo controlo positivo (E2, 1nM) em cada placa.

(4) Substâncias comuns submetidas aos ensaios STTA e VM7Luc ER TA, designadas como ER agonistas ou negativas e utilizadas para avaliar a exatidão no estudo de validação do VM7Luc ER TA [ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, quadro 4-1 (3)].

(6) A concentração máxima ensaiada na ausência de limitações devidas à citotoxicidade ou à insolubilidade foi de 1×10^{-5} M (ensaio STTA) e de 1×10^{-3} M (ensaio VM7Luc ER TA).

(7) O número entre parêntesis representa os resultados classificados como positivos (POS) ou negativos (NEG) em relação ao número total de estudos referenciados.

(1) Valores indicados no *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)*

(2) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)

(3) Foram calculados valores médios de EC₅₀ com os valores comunicados pelos laboratórios do estudo de validação do VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM e Hiyoshi) (3).

(4) A classificação como agonista do ER ou negativa baseou-se em informações constantes dos *Background Review Documents (BRD)* relativos aos métodos de ensaio do ligante do ER e de TA do ICCVAM (31), bem como em informações obtidas a partir de publicações e analisadas após a conclusão dos BRD do ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Notas: Nem todos os ensaios no âmbito do presente método recorrem às mesmas medições. Em alguns casos, o EC₅₀ não pode ser calculado porque não é gerada uma curva completa de resposta às doses. Embora com o ensaio STTA o valor PC₁₀ seja uma medição fundamental, pode haver outros exemplos em que um valor PCx fornece informações úteis.

Quadro 2
Comparação dos resultados dos ensaios SSTA e VM7Luc ER TA para substâncias ensaiadas em ambos os ensaios agonistas e classificadas como ER antagonistas (POS) ou negativas (NEG)

	Substância ^(e)	N.º CAS	Ensaio ER SSTA ⁽¹⁾		Ensaio VM7Luc ER TA ⁽²⁾		Efeitos candida- tos ER SSTA ⁽⁴⁾	Classificação consensual do ICCVAM ⁽⁵⁾ Classe de produtos químicos	MeSH ⁽⁶⁾	Classe de produ- tos ⁽⁷⁾
			Atividade ER TA	Valor IC ₅₀ ^(b) (M)	Atividade ER TA	Valor IC ₅₀ ^(b) , ^(c) (M)				
1	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	POS	3,97 × 10 ⁻⁹	POS	2,08 × 10 ⁻⁷	POS moderado	POS	Hidrocarboreto cíclico	Produtos farmacêuticos
2	Dibenzo[a,h]antraceno	53-70-3	POS	N.º IC ₅₀	POS	N.º IC ₅₀	POS	PP	Composto policíclico	Produto químico de laboratório, produto natural
3	Mifepristona	84371-65-3	POS	5,61 × 10 ⁻⁶	NEG.	—	POS moderado	NEG.	Esteróide	Produtos farmacêuticos
4	Raloxifeno-HCl	82640-04-8	POS	7,86 × 10 ⁻¹⁰	POS	1,19 × 10 ⁻⁹	POS moderado	POS	Hidrocarboreto cíclico	Produtos farmacêuticos
5	Tamoxifeno	10540-29-1	POS	4,91 × 10 ⁻⁷	POS	8,17 × 10 ⁻⁷	POS	POS	Hidrocarboreto cíclico	Produto farmacêutico
6	17β-Estradiol	50-28-2	NEG.	—	NEG.	—	PN	PN	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
7	Apigenina	520-36-5	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	NEG.	Composto heterocíclico	Corante, produto natural, produto farmacêutico intermédio

	Substância ⁽⁴⁾	N.º CAS	Ensaio ER STTA ⁽¹⁾		Ensaio VM/Luc ER TA ⁽²⁾		Efeitos candida- tos ER STTA ⁽⁴⁾	Classificação consensual do ICCVAM ⁽⁵⁾ Classe de produtos químicos	MeSH ⁽⁶⁾	Classe de produ- tos ⁽⁷⁾
			Atividade ER TA	Valor IC ₅₀ ^(b) (M)	Atividade ER TA	Valor IC ₅₀ ^(b) , ^(c) (M)				
8	Atrazina	1912-24-9	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	PN	Composto he- terocíclico	Herbicida
9	Fralato de di- <i>n</i> -butilo	84-74-2	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	NEG.	Éster de ácido ftálico	Ingrediente cosmético, pro- duto químico industrial, plas- tificante
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG.	—	NEG.	—	não ensaiado	PN	Composto he- terocíclico, pi- rimidina	Fungicida
11	Flavona	525-82-6	NEG.	—	NEG.	—	PN	PN	Flavonoide, composto he- terocíclico	Produto natu- ral, produto farmacêutico
12	Flutamida	13311-84-7	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	PN	Amida	Produto farma- cêutico, agente veterinário
13	Genisteína	446-72-0	NEG.	—	NEG.	—	PN	NEG.	Flavonoide, composto he- terocíclico	Produto natu- ral, produto farmacêutico
14	<i>p-n</i> -Nonilfenol	104-40-5	NEG.	—	NEG.	—	não ensaiado	NEG.	Fenol	Produto qui- mico intermé- dio

Substância ⁽⁴⁾	N.º CAS	Ensaio ER STTA ⁽¹⁾		Ensaio VM7Luc ER TA ⁽²⁾		Efeitos candidatos ER STTA ⁽⁴⁾	Classificação consensual do ICCVAM ⁽²⁾ Classe de produtos químicos	MeSH ⁽⁶⁾	Classe de produtos ⁽⁷⁾
		Atividade ER TA	Valor IC ₅₀ ⁽⁶⁾ (M)	Atividade ER TA	Valor IC ₅₀ ⁽⁶⁾ , ⁽³⁾ (M)				
15 Resveratrol	501-36-0	NEG.	—	NEG.	—	PN	NEG.	Hidrocarbono cíclico	Produto natural

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; M = molar; IC₅₀ = Concentração semimáxima inibitória de uma substância química em estudo; NEG = negativo; PN = negativo presumível; POS = positivo; PP = presumível positivo.

⁽⁴⁾ Substâncias comuns submetidas aos ensaios STTA e VM7Luc ER TA, designadas como ER agonistas ou negativas e utilizadas para avaliar a exatidão no estudo de validação do VM7Luc ER TA (2) (3).

⁽⁶⁾ A concentração máxima testada na ausência de limitações devidas à citotoxicidade ou à insolubilidade foi 1×10^{-3} M (ensaio STTA) e 1×10^{-5} M (ensaio VM7Luc ER TA).

⁽¹⁾ *Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B* (2)

⁽²⁾ ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

⁽³⁾ Foram calculados valores médios de IC₅₀ com os valores comunicados pelos laboratórios do estudo de validação do VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM e Hiyoshi) (3).

⁽⁴⁾ Atividade ER STTA estimada a partir de efeitos comunicados constantes dos dados históricos CER1 do ensaio de ligação ao receptor ER, do ensaio uterotrófico e de informações recolhidas na literatura publicamente disponível (2)

⁽⁵⁾ A classificação das substâncias como antagonistas do ER ou negativas baseou-se em informações constantes dos Background Review Documents (BRD) do ICCVAM (BRD) para os ensaios de ligação ER e TA (31) e em informações obtidas a partir de publicações e análises realizadas após a conclusão dos BRD do ICCVAM (2) (3) (18) (31).

⁽⁶⁾ As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes de produtos químicos com recurso a U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), uma classificação normalizada e internacionalmente reconhecida (disponível em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

⁽⁷⁾ As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes químicas com recurso ao U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponível em <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/isis/htmlgen?HDPB>).

COMPONENTES DOS ENSAIOS ER TA

Componentes de ensaio essenciais

11. O presente método de ensaio aplica-se aos ensaios que utilizam um recetor ER α transfetado estavelmente ou endógeno e um constituinte de gene repórter transfetado estavelmente sob o controlo de um ou mais elementos de resposta estrogénicos; no entanto, podem estar presentes outros recetores, como o ER β . Estes são componentes essenciais do ensaio.

Controlos

12. Deve ser descrita a base dos padrões de referência concorrentes propostos para cada ensaio de agonistas e antagonistas. Os controlos paralelos (negativo, solvente e positivo), se necessário, servem como indicação de que o método de ensaio está a funcionar nas condições do ensaio e fornecem uma base para comparações entre experiências; geralmente, são parte dos critérios de aceitabilidade de uma experiência (1).

Procedimentos normalizados de controlo de qualidade

13. Devem ser aplicados os procedimentos normalizados de controlo da qualidade descritos para cada ensaio, a fim de garantir que a linha celular se mantém estável através de passagens múltiplas, continua isenta de micoplasma (isto é, sem contaminação bacteriana) e mantém a capacidade de fornecer as respostas mediadas pelo ER previstas ao longo do tempo. As linhas celulares devem ser sujeitas a um controlo suplementar para verificar se a sua identidade está correta, bem como para identificar outros contaminantes (por exemplo, fungos, leveduras e vírus).

Demonstração da competência técnica do laboratório

14. Antes de ensaiar produtos químicos desconhecidos com qualquer um dos ensaios no âmbito do presente método de ensaio, cada laboratório deve demonstrar a sua competência na utilização do ensaio. Para demonstrar a competência, cada laboratório deve ensaiar as 14 substâncias enumeradas no quadro 3 no que respeita ao ensaio de agonistas e as 10 substâncias do quadro 4 para o ensaio antagonista. Este ensaio de competência deve também confirmar a capacidade de resposta do sistema de ensaio. A lista de substâncias de competência é um subconjunto das substâncias de referência constantes das normas de desempenho para os ensaios ER TA (6). Estas substâncias estão comercialmente disponíveis, representam as classes de produtos químicos normalmente associadas à atividade agonista ou antagonista de ER e apresentam uma gama de potência adequada e esperada para agonistas/antagonistas de ER (ou seja, de fortes a fracos) e incluem negativos. Os ensaios das substâncias de competência devem ser reproduzidos pelo menos duas vezes, em dias diferentes. A competência é demonstrada por uma classificação correta (positiva/negativa) de cada uma das substâncias. O ensaio de competência deve ser repetido por todos os técnicos quando aprendem os ensaios. Em função do tipo de célula, algumas destas substâncias de competência podem comportar-se como SERMS e exibir atividades agonistas e antagonistas. No entanto, as substâncias para a demonstração de competência são classificadas nos quadros 3 e 4 de acordo com a sua atividade predominante conhecida, que deve ser utilizada na avaliação da competência.
15. Para demonstrar o desempenho e para fins de controlo de qualidade, cada laboratório deve elaborar bases de dados históricos agonistas e antagonistas com padrões de referência (p. ex., 17 β -estradiol e tamoxifeno), produtos químicos de controlo positivo, negativo e de solvente (p.e., DMSO). Inicialmente, a base de dados deve ser gerada a partir de uma série de, pelo menos, 10 ensaios de agonistas independentes (por ex., 17 β -estradiol) e 10 ensaios de antagonistas independentes (por exemplo, tamoxifeno). Os resultados de futuras análises destes padrões de referência e dos controlos de solventes devem ser incluídos para aumentar a base de dados, a fim de garantir a coerência e o desempenho do bioensaio por parte do laboratório ao longo do tempo.

Quadro 3
 Lista de (14) substâncias para o ensaio de competência do agonistas ⁽⁸⁾

N.º ⁽⁷⁾	Substância	N.º CAS	Resposta prevista ⁽¹⁾	Ensaio STTA			Ensaio VM7Luc ER TA		Classe de produtos químicos MESH ⁽²⁾	Classe de produtos ⁽⁶⁾
				Valor PC ₁₀ (M) ⁽²⁾	Valor PC ₅₀ (M) ⁽²⁾	Ensaio Conc. Gama (M)	Valor VM7Luc EC ₅₀ (M) ⁽²⁾	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) ⁽⁴⁾		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Hidrocarbono cíclico	Agente farmacêutico de uso veterinário
12	17 α -Estradiol	57-91-0	POS	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
15	meso-Hexesterol	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Hidrocarbono cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
11	4-terc-Octilfenol	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Fenol	Produto químico intermédio
9	Genisteína	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Fenol	Produto químico intermédio

N.º (7)	Substância	N.º CAS	Resposta prevista (1)	Ensaio STTA			Ensaio VM7Luc ER TA		Classe de produtos químicos MESH (5)	Classe de produtos (6)
				Valor PC ₁₀ (M) (2)	Valor PC ₅₀ (M) (2)	Ensaio Conc. Gama (M)	Valor VM7Luc EC ₅₀ (M) (2)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) (4)		
2	Camferol	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural
3	Fralato de butilo	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Ácido carboxílico, éster, ácido ftálico	Plastificante, Produtos Químicos Industriais
4	<i>p,p'</i> -Metoxicloro	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Hidrocarboneto halogenado	Pesticida, Agente Veterinário
1	Etilparabeno	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Ácido carboxílico, fenol	Produto farmacêutico, conservante
17	Atrazina	1912-24-9	NEG.	—	—	$10^{-10} - 10^{-4}$	—	$4,64 \times 10^{-4}$	Composto heterocíclico	Herbicida
20	Espironolactona	52-01-7	NEG.	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$2,40 \times 10^{-3}$	Lactona, esteroide	Produto farmacêutico

N.º (7)	Substância	N.º CAS	Resposta prevista (1)	Ensaio STTA			Ensaio VM7Luc ER TA		Classe de produtos químicos MESH (2)	Classe de produtos (6)
				Valor PC ₁₀ (M) (2)	Valor PC ₅₀ (M) (2)	Ensaio Conc. Gama (M)	Valor VM7Luc EC ₅₀ (M) (2)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) (4)		
21	Cetoconazol	65277-42-1	NEG.	—	—	10 ⁻¹¹ – 10 ⁻⁵	—	9,41 × 10 ⁻⁵	Composto heterocíclico	Produto farmacêutico
22	Reserpina	50-55-5	NEG.	—	—	10 ⁻¹¹ – 10 ⁻⁵	—	1,64 × 10 ⁻³	Composto heterocíclico, indol	Produto farmacêutico, agente veterinário

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; EC₅₀ = Concentração semimáxima eficaz de uma substância química em estudo; NEG = negativo; POS = positivo; PC₁₀ (e PC₅₀) = concentração de uma substância de ensaio em que a resposta é 10 % (ou 50 % para PC₅₀) da resposta induzida pelo controlo positivo (E2, 1nM) em cada placa.

(1) A classificação como agonista ou negativa do ER baseou-se em informações constantes do ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods (31), bem como em informações obtidas a partir de estudos publicados e analisados após a conclusão dos BRD do CCVAM (2) (3) (18) (33) (34).

(2) Valores indicados no Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-Hela-9903 Cell Line (30)

(3) Foram calculados valores médios de EC₅₀ com os valores comunicados pelos laboratórios do estudo de validação do VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM e Hiyoshi) (3).

(4) As concentrações comunicadas foram as mais elevadas testadas (telémetro) durante a validação do ensaio VM7Luc ER TA. Se as concentrações diferirem entre os laboratórios, deve ser comunicada a concentração mais elevada. Ver quadros 3-10 do Test Method Evaluation Report do ICCVAM: Método de ensaio LUMI-Cell@ER (VM7Luc ER TA): An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

(5) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes de produtos químicos com recurso à U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), uma classificação normalizada e internacionalmente reconhecida (disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

(6) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes químicas com recurso à U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

(7) A partir do quadro 1 [lista de 22 produtos químicos de referência (22) para avaliação da exatidão das normas de desempenho do agonista ER] (6)

(8) Se uma substância de competência deixar de estar comercialmente disponível, pode utilizar-se uma substância com a mesma classificação e potência, modo de ação e classe de produtos químicos comparáveis.

Quadro 4
 Lista de (10) substâncias para o ensaio de competência de antagonistas

	Substância ⁽¹⁾	N.º CAS	Ensaio ER STTA ⁽²⁾			Ensaio VM7Luc ER TA ⁽³⁾			Efeitos candidatos ER STTA ⁽²⁾	CCVAM ⁽⁶⁾ Consensus Classification Classe de produtos químicos	MeSH ⁽⁷⁾	Classe de produtos ⁽⁸⁾
			Atividade ER TA	IC ₅₀ (M)	Gama de concentrações de ensaio (M)	Atividade ER TA	IC ₅₀ ⁽⁴⁾ (M)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) ⁽⁵⁾				
1	4-Hidroxi- xitamoxifeno	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	POS	Hydrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico	
2	Raloxifeno- -HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	POS	Hydrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico	
3	Tamoxifeno	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POS	Hydrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico	
4	17β-Estra- diol	50-28-2	NEG.	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG.	—	$3,67 \times 10^{-3}$	PN	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário	
5	Apigenina	520-36-5	NEG.	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG.	—	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG.	Composto heterocíclico	Corante, produto natural, produto farmacêutico intermédio	
6	Fralato de di- -n-butilo	84-74-2	NEG.	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG.	—	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG.	Éster, ácido ftálico	Ingrediente cosmético, produto químico industrial, plastificante	

Substância ⁽¹⁾	N.º CAS	Ensaio ER STTA ⁽²⁾			Ensaio VM7Luc ER TA ⁽³⁾			Efeitos candidatos ER STTA ⁽²⁾	CCVAM ⁽⁶⁾ Consensus Classification Classe de produtos químicos	MeSH ⁽⁷⁾	Classe de produtos ⁽⁸⁾
		Atividade ER TA	IC ₅₀ (M)	Gama de concentrações de ensaio (M)	Atividade ER TA	IC ₅₀ (4) (M)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) ⁽⁵⁾				
7	Flavona	525-82-6	NEG.	—	10 ⁻⁸ – 10 ⁻³	NEG.	—	4,50 × 10 ⁻⁴	PN	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
8	Genisteína	446-72-0	NEG.	—	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁴	NEG.	—	3,70 × 10 ⁻⁴	NEG.	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
9	p-n-Nonilfenol	104-40-5	NEG.	—	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁴	NEG.	—	4,54 × 10 ⁻⁴	NEG.	Fenol	Produto químico intermédio
10	Resveratrol	501-36-0	NEG.	—	10 ⁻⁸ – 10 ⁻³	NEG.	—	4,38 × 10 ⁻⁴	NEG.	Hidrocarboneto cíclico	Produto natural

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; M = molar; IC₅₀ = Concentração semimáxima inibitória de uma substância química em estudo; NEG = negativo; PN = negativo presumível; POS = positivo;

(*) classificada negativa de acordo com actividades de acordo com estudos publicados (2)

(1) Substâncias comuns submetidas aos ensaios STTA e VM7Luc ER TA, designadas ER agonistas ou negativas e utilizadas para avaliar a exatidão no estudo de validação do VM7Luc ER TA (2) (3).

(2) *Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)*

(3) *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)*.

(4) Foram calculados valores médios de IC₅₀ com os valores comunicados pelos laboratórios do estudo de validação do VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM e Hiyoshi) (3).

(5) As concentrações comunicadas foram as mais elevadas testadas (telémetro) durante a validação do ensaio VM7Luc ER TA. Se as concentrações diferirem entre os laboratórios, deve ser comunicada a concentração mais elevada. Ver quadros 3-11 do *Test Method Evaluation Report do ICCVAM*; Método de ensaio LUMI-Cell@ER (VM7Luc ER TA): *An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3)*.

(6) A classificação como antagonista do ER ou negativa baseou-se em informações constantes do ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods (31), bem como em informações obtidas a partir de publicações e analisadas após a conclusão dos BRD do CCVAM (2) (3) (18) (31).

(7) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes de produtos químicos com recurso ao U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), uma classificação normalizada e internacionalmente reconhecida (disponível em <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(8) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes químicas com recurso ao U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponível em <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/isis/htmlgen?HIDPB>).

Critérios de aceitabilidade dos ensaios

16. A aceitação ou rejeição de uma série de ensaios baseia-se na avaliação dos resultados obtidos para os padrões de referência e dos controlos utilizados para cada experiência. Os valores para PC_{50} (EC_{50}) ou IC_{50} (padrões de referência) devem satisfazer os critérios de aceitabilidade previstos para o ensaio selecionado (para STTA ver apêndice 2, para VM7Luc ER TA ver apêndice 3), e todos os controlos positivos/negativos devem ser corretamente classificados para cada experiência aceite. A capacidade de efetuar o ensaio de forma consistente deve ser demonstrada através da criação e da manutenção de uma base de dados histórica das normas e controlos de referência (ver ponto 15). Os desvios-padrão (desvio-padrão) ou os coeficientes de variação (CV) das médias dos padrões de referência para os parâmetros das curvas de várias experiências podem ser utilizados como indicadores da reprodutibilidade interna do laboratório. Além disso, devem cumprir-se os seguintes princípios relativos aos critérios de aceitabilidade:
- Os dados devem ser suficientes para efetuar uma avaliação quantitativa da ativação ER (ensaio de agonistas) ou supressão (ensaio antagonistas) (isto é, eficácia e potência).
 - A atividade média do repórter para a concentração dos estrogénios de referência deve ser, pelo menos, a mínima especificada nos ensaios relativamente ao controlo do veículo (solvente), a fim de garantir a devida sensibilidade. Para os ensaios STTA e VM7Luc ER, esta é quatro vezes a da média do controlo do veículo (solvente) de cada placa.
 - As concentrações ensaiadas devem manter-se no intervalo de solubilidade dos produtos químicos em estudo e não demonstrar citotoxicidade.

Análise dos dados

17. O procedimento de interpretação dos dados definido para cada ensaio deve ser utilizado para classificar uma resposta positiva e negativa.
18. O cumprimento dos critérios de aceitação (ponto 16) indica que o ensaio está a funcionar corretamente, mas não assegura que um determinado ensaio específico produza dados exatos. A replicação dos resultados da primeira série de ensaios é a melhor indicação de que foram produzidos dados exatos. Se duas séries de ensaios derem resultados reprodutíveis (por exemplo, os resultados dos dois ensaios indicarem que um produto químico em estudo é positivo), não é necessário realizar uma terceira série de ensaios.
19. Se duas séries de ensaios não permitirem obter resultados reprodutíveis (por exemplo, um produto químico em estudo der positivo numa série e negativo na outra) ou se for necessário um grau de certeza mais elevado quanto ao resultado deste ensaio, devem realizar-se pelo menos três séries de ensaios independentes. Neste caso, a classificação baseia-se em dois resultados concordantes em três.

Critérios gerais para a interpretação dos dados

20. Não existe atualmente um método universalmente aceite para a interpretação dos dados ER TA. No entanto, a avaliação qualitativa (por exemplo positivo/negativo) e/ou quantitativa (p. ex., EC_{50} , PC_{50} , IC_{50}) da atividade mediada pelo ER deve basear-se em dados empíricos e em pareceres científicos sólidos. Sempre que possível, os resultados positivos devem ser caracterizados pela magnitude do efeito em comparação com o do controlo do veículo (solvente) ou do estrogénio de referência, bem como pela concentração a que o efeito se produz (por exemplo, EC_{50} , PC_{50} , $RPC_{máx}$, IC_{50} , etc.).

Relatório de ensaio

21. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Método de ensaio:

- Método de ensaio utilizado;
- Padrões de controlo/referência/produto químico em estudo
- Origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida

- Estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;
- Solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente, se conhecida;
- Medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente:

- Aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- Caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Solvente/veículo:

- Caracterização (natureza, fornecedor e lote);
- Justificação para a escolha do solvente/veículo;
- Solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Células:

- Tipo e origem das células:
 - É o ER expresso endogenamente? Na negativa, que recetor(es) foi/foram transfetado(s)?
 - Constituinte(s) do(s) repórter(es) utilizado(s) (incluindo as espécies de origem);
 - Método de transfeção;
 - Método de seleção para a manutenção da estabilidade da transfeção (quando aplicável);
 - O método de transfeção é relevante para linhas estáveis?
- Número de passagens celulares (desde a descongelação);
- Número de passagens celulares aquando da descongelação;
- Métodos de manutenção das culturas celulares.

Condições de realização do ensaio:

- Limitações da solubilidade;
- Descrição dos métodos de avaliação da viabilidade aplicados;
- Composição dos meios, concentração de CO₂;
- Concentrações do produto químico em estudo;
- Volumes adicionados do veículo e produto químico em estudo;
- Temperatura e humidade de incubação;
- Duração do tratamento;
- Densidade celular no início e no decurso do tratamento;
- Padrões de referência positivos e negativos;
- Reagentes do repórter (nome do produto, fornecedor e lote);
- Critérios definidos para que o ensaio seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo.

Verificação da aceitabilidade:

- Fator de indução de cada placa de ensaio e se cumprem o mínimo exigido pelo ensaio com base em controlos históricos;
- Valores reais para critérios de aceitabilidade, por exemplo, $\log_{10}(EC_{50})$, $\log_{10}(PC_{50})$, $\log_{10}(IC_{50})$ e valores da curva de Hill para os controlos positivos/padrões de referência;

Resultados:

- Dados brutos e normalizados;
- Nível do fator de indução máximo;
- Dados relativos à citotoxicidade;
- Se existir, a concentração mínima eficaz (LEC);
- Valores $RPC_{m\acute{a}x}$, $PC_{m\acute{a}x}$, PC_{50} , IC_{50} e/ou EC_{50} , consoante o caso;
- Relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;

- Análise estatística, se for caso disso, associada a uma medida de erro e confiança (por exemplo, SEM, DP, CV ou IC 95 %) e descrição da forma como os valores foram obtidos.

Discussão dos resultados

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): p. 5367-73.
- (5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): p. 67-82.
- (6) OCDE (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) OCDE (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: p. 20- 6.
- (10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): p. 1073-89.
- (11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63- 6.
- (12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): p. 179-189.

- (13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): p. 173-187.
- (14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Recetor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): p. 91- 98.
- (15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*,28(1): p. 81-118.
- (16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Recetor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol*,71(10): p. 1459-69.
- (17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett*, 102-103, 677-680.
- (18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- (19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Recetor and Androgen Recetor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Recetor β - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): p. 379-383.
- (21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Recetor β (hER β) and its Heterodimerization with ER α *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): p. 122-126.
- (22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Recetor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*,82(12): p. 4258-4265.
- (23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Recetor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Recetor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): p. 204-211.
- (24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Recetor Alpha and Estrogen Recetor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): p. 105-12.
- (25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Recetor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): p. 1703-1714.
- (26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Recetor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): p. 558-568.
- (27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Recetor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): p. 1460-1468.
- (28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Recetors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): p. 515-522.
- (29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Recetors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: p. 45-80.

- (30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Recetor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3):p. 547-569.
- (31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Recetor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505).
- (32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.
- (33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.
- (34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone recetors, *Cancer* 63, 280-288.
- (36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Adequação: descrição da relação de um ensaio com o objeto de interesse e da sua importância e utilidade para um determinado fim. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação comporta a exatidão (concordância) de um ensaio (1).

Agonista: substância que produz uma resposta, por exemplo, transcrição, quando se liga a um recetor específico.

Antagonista: tipo de ligando a recetor ou produto químico que não provoca uma resposta biológica com a ligação a um recetor, mas bloqueia ou amortece respostas mediadas por agonistas.

ARN: ácido ribonucleico.

Atividade antiestrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação do 17 β -estradiol mediada por recetores de estrogénios.

Atividade estrogénica: a capacidade de um produto químico reproduzir o 17 β -estradiol na sua capacidade de se fixar em recetores de estrogénio e de os ativar. O presente método de ensaio permite detetar atividade estrogénica mediada por hER α .

CF: quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de desreguladores do sistema endócrino.

Citotoxicidade: efeitos nocivos para a estrutura ou a função celular que podem causar a morte celular e se podem traduzir numa redução do número de células presentes no poço no final do período de exposição ou numa redução da capacidade para uma medida da função celular, quando comparada com o controlo do veículo simultâneo.

Crítérios de aceitabilidade: normas mínimas para a realização de controlos experimentais e padrões de referência. Para que uma experiência seja considerada válida, devem ser satisfeitos todos os critérios de aceitabilidade.

CP (Amostra de controlo positivo): substância fortemente ativa, de preferência 17 β -estradiol, que é incluída em todos os ensaios para ajudar a garantir o bom funcionamento do método.

CP₁₀: concentração do produto químico em estudo a que a atividade medida num ensaio de agonistas é igual a 10 % da atividade máxima induzida pelo controlo positivo (E2 a 1nM para o ensaio STTA) em cada placa.

CP₅₀: concentração do produto químico em estudo em que a atividade medida num ensaio de agonistas é igual a 50 % da atividade máxima induzida pelo PC (E2 com a concentração de referência indicada no método de ensaio) em cada placa.

CP_{máx}: concentração do produto químico em estudo que induz a RPC Máx.

CV: coeficiente de variação.

Competência técnica: capacidade comprovada para efetuar um ensaio de forma adequada antes de ensaiar substâncias desconhecidas.

Controlo positivo fraco: substância fracamente ativa, selecionada a partir da lista de substâncias químicas de referência que está incluída em todos os ensaios a fim de assegurar o correto funcionamento do ensaio.

DCC-FBS: soro fetal bovino tratado com carvão revestido com dextrano.

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DP: desvio-padrão.

E2: 17 β -estradiol.

EC50: concentração semimáxima efetiva de um produto químico em estudo.

ED: desregulação do sistema endócrino.

Ensaio STTA: ensaio de transativação transfetada de forma estável, o ensaio de ativação transcricional ER α com recurso à linha celular HeLa 9 903.

Ensaio «me-too»: expressão coloquial para designar um método que é, estrutural e funcionalmente, semelhante a um método de ensaio de referência validado e aceite. O termo é sinónimo de «método de ensaio similar».

Estrogénio de referência (controlo positivo, PC): 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Estudo: todo o trabalho experimental realizado para avaliar uma substância única e específica através de um ensaio específico. Um estudo compreende todas as etapas, incluindo ensaios de diluição da substância em estudo nos meios de ensaio, séries de ensaios preliminares para avaliações da gama, todas as séries de ensaios exaustivos necessárias, análises de dados, controlo de qualidade, avaliações de citotoxicidade, etc. A realização de um estudo permite a classificação da atividade do produto químico em estudo no alvo de toxicidade (ou seja, ativo, inativo ou inconclusivo), que é avaliada pelo método usado e por uma estimativa de potência em relação ao produto químico de referência positiva.

Exatidão (concordância): grau de concordância entre os resultados do ensaio e um valor de referência aceite. Constitui uma medida da eficiência do método e um aspeto da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (1).

ERE: elemento de resposta do estrogénio.

ERTA: transativação do recetor de estrogénio.

Especificidade: proporção de substâncias negativas/inativa que é corretamente classificada pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação de um método (1).

FBS: soro fetal bovino.

Fiabilidade: indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios utilizando o mesmo protocolo. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial.

hER α : recetor alfa de estrogénio humano.

hER β : recetor beta de estrogénio humano.

HeLa: linha celular imortal do colo do útero humano.

HeLa9903: subclone da célula HeLa para a qual foram transfetados de forma estável hERAs e um gene repórter da luciferase.

IC₅₀: concentração semimáxima efetiva de um produto químico em estudo inibidor.

ICCVAM: Comité de Coordenação Interagências na Validação de Métodos Alternativos.

LEC: menor concentração eficaz é a menor concentração do produto químico em estudo que produz uma resposta (ou seja, a menor concentração do produto químico em estudo em que o fator de indução é estatisticamente diferente do controlo do veículo concorrente).

Morfologia celular: forma e aspeto das células cultivadas numa única camada num único poço de uma placa de cultura de tecidos. As células que estão a morrer apresentam muitas vezes uma morfologia celular anormal.

MSE: meio sem estrogénio. Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado com 4,5 % de FBS tratado com carvão/dextrano, 1,9 % de L-glutamina e 0,9 % de «pen-strep».

MCE: Menor Concentração Eficaz. É a menor concentração do produto químico em estudo que produz uma resposta (ou seja, a menor concentração do produto químico em estudo em que o fator de indução é estatisticamente diferente do controlo do veículo concorrente).

Método de ensaio: no contexto do presente método de ensaio, um ensaio é uma das metodologias aceites como válidas para cumprir os critérios de desempenho indicados. Os componentes do ensaio incluem, por exemplo, a linha celular específica com as condições de crescimento associadas, o meio específico em que o ensaio é efetuado, as condições de configuração das placas, disposições e diluições dos produtos químicos em estudo, a par de outras medidas de controlo da qualidade exigidas e de etapas de avaliação dos dados conexas.

Método de ensaio validado: método de ensaio relativamente ao qual foram realizados estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluindo a exatidão) e fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (1).

Métodos de ensaio de referência: ensaios em que se baseia o PBTG 455.

MMTV: vírus do tumor mamário do rato.

MT: metalotioneína.

Normas de desempenho: normas assentes num método de ensaio validado que constituam uma base para avaliar a comparabilidade de um ensaio proposto que seja mecanística e funcionalmente similar. Incluem: (1) componentes essenciais do método de ensaio; (2) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (3) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (1).

OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

Padrão de referência: substância de referência utilizada para demonstrar a adequação de um ensaio. O 17 β -estradiol é o padrão de referência para os ensaios STTA e VM7Luc ER TA.

PBTG: diretriz de ensaio baseada no desempenho.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

RCP_{máx}: nível máximo de resposta induzido pelo produto químico em estudo, expresso em percentagem da resposta induzida por 1 nM E2 na mesma placa.

RE: recetor de estrogénio.

Reprodutibilidade interlaboratorial: medida do grau em que diferentes laboratórios qualificados que utilizam o mesmo protocolo e testam as mesmas substâncias podem produzir resultados qualitativa e quantitativamente similares. A reprodutibilidade interlaboratorial é determinada durante os processos de pré-validação e validação e indica em que medida um método pode ser transferido com êxito entre laboratórios, igualmente designada «reprodutibilidade entre laboratórios» (1).

Reprodutibilidade intralaboratorial: medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório consegue replicar resultados com êxito utilizando o mesmo protocolo, em momentos diferentes. Igualmente designada «reprodutibilidade intralaboratorial» (1).

RLU: unidades de luz relativas.

RPMI: meio RPMI 1 640 complementado com 0,9 % de «pen-strep» e 8,0 % de soro fetal bovino (FBS).

Sensibilidade: proporção de todas as substâncias positivas/ativas que é corretamente classificada pelo método. Constitui uma medida da exatidão de um método cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação de um método (1).

Série de ensaios: experiência individual que avalia a ação química sobre o resultado biológico do ensaio. Cada série de ensaios constitui uma experiência completa realizada em poços de células retiradas de um mesmo agregado de células ao mesmo tempo.

Série de ensaios independente: experiência realizada independente que avalia a ação química sobre o resultado biológico do ensaio, utilizando células de um conjunto diferente de produtos químicos recém-diluídos, realizada em dias diferentes ou no mesmo dia por pessoas diferentes.

Substância: nos termos do REACH, uma substância é definida como um elemento químico e seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de fabrico, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza que derive do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição. No contexto do sistema GHS da ONU é utilizada uma definição muito semelhante⁽¹⁾.

Substâncias para demonstração de competência: subconjunto das substâncias de referência incluídas nas normas de desempenho que podem ser utilizadas pelos laboratórios para demonstrar a sua competência técnica com um método de ensaio normalizado. Os critérios de seleção destas substâncias incluem normalmente o facto de representarem a gama de respostas, estarem comercialmente disponíveis e disporem de dados de referência de elevada qualidade.

TA (Transativação): início da síntese do mRNA em resposta a um sinal químico específico, como uma ligação de um estrogénio no recetor de estrogénios.

Tratamento por carvão vegetal/dextrano: tratamento de soro utilizado na cultura celular. O tratamento com carvão vegetal/dextrano (frequentemente designado «separação») retira hormonas endógenas e proteínas de ligação de hormonas.

Transfeção estável: quando o ADN é transferido para células de cultura de modo a ser estávelmente integrado no genoma celular, o que resulta na expressão estável dos genes transfetados. Os clones de células transfetadas de forma estável são selecionados por marcadores estáveis (por exemplo, resistência ao G418).

Transcrição: síntese do mRNA.

UVCB: substâncias químicas de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos.

Validação: processo de estabelecimento da fiabilidade e adequação de uma determinada abordagem, método, processo ou avaliação para um determinado fim (1).

VC (controlo do veículo): solvente que é utilizado para dissolver os produtos químicos em estudo e de controlo; é testado exclusivamente na qualidade de veículo, sem adição de produtos químicos dissolvidos.

VM7: célula de adenocarcinoma imortalizada que endogenamente expressa o recetor de estrogénio.

VM7Luc4E2: linha celular VM7Luc4E2, obtida a partir de células VM7 imortalizadas de adenocarcinoma de origem humana, que expressam endogenamente ambas as formas do recetor de estrogénios (ER α e ER β) e que foram transfetadas de forma estável, com o plasmídeo pGudLuc7.ERE. O plasmídeo contém quatro cópias de um oligonucleótido sintético que contém o elemento de resposta estrogénica a montante do promotor do tumor mamário viral do rato (MMTV) e o gene da luciferase do pirilampo

(1) 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 Directiva 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 Directiva 76/769/CEE do Conselho e as Diretivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE (JO L 396 de 30.12.2006, p. 1).

Apêndice 2

RECTOR A DE ESTROGÉNIO HUMANO TRANSFETADO DE FORMA ESTÁVEL. ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÉNICA AGONISTA E ANTAGONISTA NOS PRODUTOS QUÍMICOS COM RECURSO À LINHA CELULAR HERA-HELA-9903

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. O presente ensaio de transativação (TA) utiliza a linha celular hER α -HeLa-9 903 para detetar atividade estrogénica agonista mediada por um recetor de estrogénio humano alfa (hER α). O estudo de validação do ensaio de transativação transfetada de forma estável, realizado pelo Japanese Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI), utilizando a linha celular hER α -HeLa-9 903 para detetar atividade estrogénica agonista e antagonista mediada pelo recetor alfa de estrogénio humano (hER α), demonstrou a adequação e a fiabilidade do ensaio para o fim a que se destina (1).
2. O ensaio foi concebido especificamente para a deteção de TA mediada pelo hER α , tendo como parâmetro a medição por quimioluminescência. No entanto, foram referidos sinais de luminescência não mediada pelo recetor em concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 μ M devido à sobreativação do gene repórter da luciferase (2) (3). Embora a curva de respostas à dose indique que a ativação real do sistema do ER ocorre a concentrações inferiores, é necessário examinar cuidadosamente a expressão da luciferase obtida em concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de compostos similares suspeitos de produzirem o mesmo tipo de sobreativação de fitoestrogénios do gene repórter da luciferase nos sistemas de ensaio de ER TA transfetados de modo estável (apêndice 1).
3. Devem ler-se as secções «INTRODUÇÃO GERAL» e «COMPONENTES DO ENSAIO DE ER TA» antes de utilizar este ensaio para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice 2.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

4. O presente ensaio é utilizado para fixar um sinal no recetor de estrogénio com um ligando. Após a ligação do ligando, o complexo recetor-ligando transloca-se para o núcleo, onde se fixa a elementos de resposta de ADN específicos e transativa um gene repórter da luciferase do pirilampo que provoca um aumento da expressão celular da enzima luciferase. A luciferina é um substrato que é transformado pela enzima luciferase num produto bioluminescente mensurável quantitativamente com um luminómetro. A atividade da luciferase pode ser avaliada de forma rápida e pouco onerosa, com vários conjuntos de ensaio existentes no mercado.
5. O sistema de ensaio utiliza a linha celular hER α -HeLa-9 903, que é derivada de um tumor do colo do útero humano, com dois elementos estavelmente inseridos: (i) o elemento de expressão hER α s (que codifica o recetor humano) e (ii) um elemento do repórter da luciferase pirilampo com cinco repetições de um elemento de vitelogenina responsivo ao estrogénio (ERE), conduzidos por um elemento TATA promotor de metalotioneína (MT) do rato. Foi demonstrado que o constituinte TATA MT do gene do rato tem o melhor desempenho, pelo que é frequentemente utilizado. Por conseguinte, esta linha celular hER α -HeLa-9 903 pode medir a capacidade de um produto químico em estudo de induzir a transativação da expressão do gene da luciferase mediada pelo hER α .
6. No caso do ensaio do agonista do ER, a interpretação dos dados baseia-se no facto de o nível máximo de resposta induzido por um produto químico em estudo ser ou não igual ou superior a uma resposta agonista igual a 10 % da resposta induzida por uma concentração indutora maximizada (1 nM) do agente de controlo positivo (PC) 17 β -estradiol (E2) (ou seja, o PC₁₀). No caso do ensaio de antagonistas do ER, a interpretação dos dados baseia-se no facto de a resposta revelar, ou não, uma redução de pelo menos 30 % da atividade da resposta induzida pelo pico do controlo (25 pM de E2) sem citotoxicidade. A análise e a interpretação dos dados são abordadas em pormenor nos pontos 34 a 48.

PROCEDIMENTO

Linhas celulares

7. Para o ensaio, deve utilizar-se a linha celular HeLa-9 903 transferida de modo estável. A linha celular pode ser obtida na Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank ⁽¹⁾, mediante a assinatura de um acordo de transferência de material (MTA).
8. Só devem ser utilizadas nos ensaios células caracterizadas como isentas de micoplasmas. O RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) é o método ideal para uma deteção sensível de infeção por micoplasmas (4) (5) (6).

Estabilidade da linha celular

9. Para monitorizar a estabilidade da linha celular, devem utilizar-se E2, 17 α -estradiol, 17 α -metiltestosterona e corticosterona como padrões de referência para ensaios de agonista, devendo ser medida uma curva completa de respostas à concentração da gama concentrações de ensaio constantes do quadro 1, pelo menos, uma vez sempre que o ensaio for realizado, devendo os resultados estar de acordo com os apresentados no quadro 1.
10. No caso do ensaio antagonista, devem ser medidas em paralelo, em cada série de ensaios, as curvas de concentração completas para dois padrões de referência – taxifeno e flutamida. A classificação qualitativa correta como positiva ou negativa para os dois produtos químicos deve ser monitorizada.

Cultura celular e condições de incubação em placas

11. As células devem ser mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM) sem vermelho de fenol, complementado com 60 mg/l do antibiótico canamicina e 10 % de soro fetal bovino tratado com carvão revestido de dextrano (DCC-SFB), numa incubadora de CO₂ (5 % CO₂) a 37 \pm 1 °C. Quando atingem uma confluência de 75-90 %, as células podem ser subcultivadas em 10 ml de 0,4 \times 10⁵ – 1 \times 10⁵ células/ml para recipientes de cultura de 100 mm. As células devem ser suspensas com 10 % de SFB-EMEM (que é o mesmo que EMEM com DCC-FBS) e, em seguida, colocadas em poços de uma microplaca a uma densidade de 1 \times 10⁴ células/(100 μ l \times poço). Em seguida, as células devem ser pré-incubadas numa incubadora com 5 % de CO₂ a 37 \pm 1 °C durante 3 horas antes da exposição ao produto químico. Os artigos de plástico não devem ter atividade estrogénica.
12. Para manter a integridade da resposta, as células devem ser cultivadas por mais do que uma passagem da cultura congelada nos meios condicionados e não devem ser cultivadas por mais de 40 passagens. No caso da linha celular hER α -HeLa-9 903, este período deve ser inferior a três meses. Contudo, o desempenho das células pode ser reduzido se forem cultivadas em condições de cultura inadequadas.
13. O DCC-FBS pode ser preparado como descrito no apêndice 2.2, ou obtido no comércio.

Crítérios de aceitabilidade

Padrões de referência positivos e negativos para o ensaio de agonistas do ER

14. Antes e durante o estudo, deve verificar-se a capacidade de resposta do sistema de ensaio utilizando as concentrações adequadas de um estrogénio forte (E2), um estrogénio fraco (17 α -estradiol), um agonista muito fraco (17 α -metiltestosterona) e uma substância negativa (corticosterona). Os valores de gama aceitáveis derivados do estudo de validação (1) são indicados no quadro 1. Estes 4 padrões de referência concomitantes devem ser incluídos em todas as experiências e os resultados devem situar-se dentro dos limites admissíveis. Se tal não for o caso, deve averiguar-se a causa da impossibilidade de cumprir os critérios de aceitabilidade (por exemplo, manipulação das células, soro e antibióticos para a qualidade e concentração) e o ensaio deve ser repetido. Uma vez cumpridos os critérios de aceitabilidade, é

⁽¹⁾ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan. Fax: +81-72-641-9812

essencial uma utilização consistente dos materiais de cultura celular para assegurar a variabilidade mínima dos valores de EC₅₀, PC₅₀ and PC₁₀. Os quatro padrões de referência concorrentes, que devem ser incluídos em cada ensaio (realizado nas mesmas condições, incluindo os materiais, o nível de passagem das células e os técnicos), podem garantir a sensibilidade do ensaio, na medida em que os PC₁₀ dos três padrões de referência positivos devem situar-se dentro da gama aceitável, tal como os PC₅₀ e EC₅₀, quando puderem ser calculados (ver quadro 1).

Quadro 1

Gama de valores aceitáveis dos quatro padrões de referência para o ensaio de ER agonista

Nome	log(PC ₅₀)	log(PC ₁₀)	log(EC ₅₀)	Curva de Hill	Gama de ensaio
17β-Estradiol (E2) N.º CAS: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻⁸ M
17α-Estradiol N.º CAS: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ M
Corticosterona N.º CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁴ M
17α-Metiltestosterona N.º CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁵ M

Padrão de referência positivo e negativo para o ensaio de antagonistas do ER

15. Antes e durante o estudo, deve verificar-se a capacidade de resposta do sistema de ensaio utilizando as concentrações adequadas de uma substância positiva (tamoxifeno) e de uma substância negativa (flutamida). Os valores de gama aceitáveis derivados do estudo de validação (1) são indicados no quadro 2. Estes dois padrões de referência concorrentes devem ser tidos em conta em todas as experiências, devendo os resultados ser considerados corretos, conforme indicado nos critérios. Se tal não for o caso, há que determinar a causa do incumprimento dos critérios (por exemplo, manipulação de células, soro e antibióticos para a qualidade e a concentração) e o ensaio deve ser repetido. Além disso, devem calcular-se os valores IC₅₀ para uma substância positiva (tamoxifeno), devendo os resultados situar-se dentro dos limites aceitáveis indicados. Quando os critérios de aceitabilidade tiverem sido alcançados, é essencial a utilização coerente dos materiais de cultura de células para assegurar a variabilidade mínima dos valores IC₅₀. Os dois padrões de referência concorrentes, que devem ser utilizados em cada experiência (realizadas nas mesmas condições, incluindo os materiais, o nível de passagem das células e os técnicos), podem garantir a sensibilidade do ensaio (ver quadro 2).

Quadro 2

Critérios e gama de valores aceitáveis dos dois padrões de referência para o ensaio de antagonistas do ER

Nome	Critérios	log (IC ₅₀)	Gama de ensaio
Tamoxifeno N.º CAS: 10 540-29-1	Positivos: O IC ₅₀ deve ser calculado	-5,942~-7,596	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M
Flutamida N.º CAS: 13 311-84-7	Negativos: O IC ₃₀ não deve ser calculado	—	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M

Controlos positivos e controlo do veículo

16. O controlo positivo (PC) do ensaio de agonistas do ER (1 nM de E2) e do ensaio de antagonistas do ER (10 µM TAM) deve ser efetuado, pelo menos, em triplicado em cada placa. O veículo utilizado para dissolver um produto químico em estudo deve ser ensaiado como controlo do veículo (VC), pelo menos, em triplicado em cada placa. Além deste CV, se o PC utilizar um veículo diferente do produto químico em estudo, deve ensaiar-se outro CV, pelo menos em triplicado, na mesma placa com o PC.

Critérios de qualidade para o ensaio de agonistas do ER

17. A atividade da luciferase do controlo positivo (1 nM E2) deve ser pelo menos 4 vezes superior à do CV médio em cada placa. Este critério baseia-se na fiabilidade dos valores dos parâmetros do estudo de validação (historicamente um fator entre 4 e 30).
18. Em relação ao controlo de qualidade do ensaio, o fator de indução correspondente ao valor PC₁₀ do PC simultâneo (1 nM E2 deve ser superior a 1+2DP do valor do fator de indução (=1) do VC simultâneo. Para efeitos de definição de prioridades, o valor PC₁₀ pode ser útil para simplificar a análise de dados necessária comparativamente a uma análise estatística. Embora uma análise estatística forneça informações sobre a significância, essa análise não é um parâmetro quantitativo no que diz respeito ao potencial com base na concentração, pelo que é menos útil para efeitos de definição de prioridades.

Critérios de qualidade para o ensaio de antagonistas do ER

19. A atividade média da luciferase no pico do controlo (25 pM E2) deve ser pelo menos 4 vezes superior à atividade média do CV em todas as placas. Este critério é estabelecido com base na fiabilidade dos valores dos parâmetros do estudo de validação.
20. Em relação ao controlo de qualidade do ensaio, a ativação transcricional relativa (RTA) de 1 nM E2 deve ser superior a 100 %, a RTA de 1 µM 4-hidroxitamoxifeno (OHT) deve ser inferior a 40,6 % e a RTA de 100 µM de digitonina (Dig) deve ser inferior a 0 %.

Demonstração da competência técnica do laboratório (ver os pontos 14 e os quadros 3 e 4 em «COMPONENTES DO ENSAIO DE ER TA» do presente método de ensaio).

Veículo

21. Deve utilizar-se como VC, ensaiado em paralelo, dimetilsulfóxido (DMSO) ou um solvente adequado, na concentração utilizada para os diferentes controlos positivos e negativos, bem como os produtos químicos em estudo. Estes devem ser dissolvidos num solvente que os dissolva e seja miscível no meio celular. A água, o etanol (95 % a 100 % de pureza) e o DMSO são veículos adequados. Caso se utilize DMSO, o seu teor não deve exceder 0,1 % (v/v). Para qualquer veículo, deve demonstrar-se que o volume máximo utilizado não é citotóxico e não interfere com o desempenho do ensaio.

Preparação dos produtos químicos em estudo

22. Em geral, os produtos químicos em estudo devem ser dissolvidos em DMSO ou noutro solvente adequado e diluídos sequencialmente com o mesmo solvente, à razão de 1:10, a fim de preparar soluções para diluição no meio.

Solubilidade e citotoxicidade: Considerações para a determinação da gama de dosagem

23. Deve ser efetuado um ensaio preliminar para determinar a gama de concentrações adequada do produto químico em estudo e se este pode apresentar problemas de solubilidade ou citotoxicidade. Inicialmente, os produtos químicos são ensaiados até à concentração máxima de 1 µg/ml, 1 mg/ml ou 1 mM, consoante a que for mais baixa. Com base no grau de citotoxicidade ou na falta de solubilidade observados no ensaio preliminar, a primeira série de ensaios definitiva deve utilizar o produto químico em algoritmos sequenciais de diluições a partir da concentração máxima aceitável (por exemplo, 1 mM, 100 µM, 10 µM, etc.), observando a presença de turbidez, precipitado ou citotoxicidade. As concentrações da segunda e, se necessário, terceira séries de ensaios devem ser ajustadas conforme adequado para melhor caracterizar a curva de respostas à concentração e evitar concentrações que se verifique serem insolúveis ou produzam citotoxicidade excessiva.

24. No caso dos agonistas e antagonistas do ER, a presença de níveis crescentes de citotoxicidade pode alterar significativamente ou eliminar a resposta sigmoide característica e deve ser tida em conta na interpretação dos dados. Devem utilizar-se métodos de ensaio de citotoxicidade que possam fornecer informações sobre a viabilidade de 80 % das células, com recurso a um ensaio adequado baseado na experiência adquirida no laboratório.
25. Caso os resultados do ensaio de citotoxicidade revelem que a concentração do produto químico em estudo reduziu o número de células em 20 % ou mais, esta concentração deve ser considerada citotóxica e devem excluir-se da avaliação as concentrações iguais ou superiores à de concentração citotóxica.

Exposição ao produto químico e organização das placas do ensaio

26. O procedimento relativo às diluições do produto químico (etapas 1 e 2) e à exposição a células (etapa 3) é o seguinte:

Etapa 1: Cada produto químico deve ser diluído sequencialmente em DMSO, ou num solvente apropriado, e adicionado aos poços de uma placa de microtitulação para atingir as concentrações sequenciais finais determinadas pelo ensaio preliminar de determinação das gamas de dosagem [geralmente, numa série de, por exemplo, 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM e 10 pM (10^{-3} - 10^{-11} M)] para ensaio em triplicado.

Etapa 2: diluição do produto químico: Em primeiro lugar, diluir 1,5 µl do produto químico em estudo no solvente até um volume de 500 µl no meio.

Etapa 3: exposição das células ao produto químico: Adicionar 50 µl da diluição com o meio (preparada na etapa 2) a um poço que contenha 10^4 células/100 µl/poço.

O volume final recomendado de meio para cada poço é de 150 µl. As amostras para ensaio e os padrões de referência podem ser afetados como indicado no quadro 3 e no quadro 4.

Quadro 3

Exemplo da atribuição de concentração por placa dos padrões de referência na placa de ensaio no ensaio de agonistas do ER

Linha	17α-metiltestosterona			Corticosterona			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	Conc. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Conc. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Conc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Conc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Conc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Conc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controlo positivo (1 nM E2)

27. Os padrões de referência (E2, (E2, 17 α -estradiol, 17 α -metiltestosterona devem ser ensaiados em todas as séries de ensaios (quadro 3). Apenas os poços do PC tratados com 1 nM de E2 que podem produzir a indução máxima de E2 e os poços de VC tratados com DMSO (ou solvente apropriado) devem ser incluídos em todas as placas de ensaio (quadro 4). Se forem utilizadas células de diferentes origens (p. ex. números de passagem diferentes, lotes diferentes, etc.) na mesma experiência, os padrões de referência devem ser ensaiados para cada origem de células.

Quadro 4

Exemplo de atribuição de concentrações a placas de ensaio e placas dos produtos químicos em estudo e de controlo das placas no ensaio de agonistas do ER

Linha	Produto químico em estudo 1			Produto químico em estudo 2			Produto químico em estudo 3			Produto químico em estudo 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc. 1 (10 μ M)	→	→	1 nM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	Conc. 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Conc. 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Conc. 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Conc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Conc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Conc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controlo positivo (1 nM E2)

Quadro 5

Exemplo de atribuição das concentrações por placa dos padrões de referência na placa de ensaio no ensaio de antagonistas do ER

Linha	Tamoxifeno			Flutamida			Produto químico em estudo 1			Produto químico em estudo 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	conc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	conc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controlo positivo (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifeno, Dig: digitonina.

 = enriquecida com 25pM E2

28. Para avaliar a atividade antagonista dos produtos químicos, os poços de ensaio situados nas linhas A a G devem ser enriquecidos com 25pM E2. Os padrões de referência (tamoxifeno e flutamida) devem ser ensaiados em todas as séries de ensaios. Os poços de PC tratados com 1 nM de E2 que podem ser utilizados para o controlo da qualidade da linha celular hER α -HeLa-9 903, os poços VC tratados com DMSO (ou com um solvente adequado), os poços de 0,1 % de DMSO, tratados com adição de DMSO ao E2 enriquecido correspondente ao pico no controlo, os poços tratados com a concentração final 1 μ M OHT e os poços tratados com 100 μ M Dig devem ser incluídos em todas as placas de ensaio (quadro 5). A placa de ensaio subsequente deve ter a mesma configuração, sem poços de padrões de referência (quadro 6). Se forem utilizadas células de diferentes origens (p. ex., números de passagem diferentes, lotes diferentes, etc.) na mesma experiência, os padrões de referência devem ser ensaiados para cada origem de células.

Quadro 6

Exemplo de atribuição de concentrações de placas ao produto químico em estudo e de controlo na placa do ensaio de antagonistas do ER

Linha	Produto químico em estudo 1			Produto químico em estudo 2			Produto químico em estudo 3			Produto químico em estudo 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	Conc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	Conc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Conc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Conc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Conc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veiculo (0,1 % DMSO), PC: Controlo positivo (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifeno, Dig: digitonina.

 : Enriquecido com 25 pM E2

29. A ausência de efeitos de borda deve ser confirmada, conforme adequado; se houver suspeitas desses efeitos, a configuração das placas deve ser alterada para evitá-los. Pode utilizar-se, por exemplo, uma configuração que exclua os poços de borda.
30. Após a adição dos produtos químicos, as placas de ensaio devem ser incubadas numa incubadora com 5 % de CO₂, a 37 °C \pm 1 °C, durante 20 a 24 horas, para induzir os produtos génicos repórteres.
31. Os compostos altamente voláteis requerem considerações específicas. Nesses casos, os poços de controlo próximos podem gerar falsos positivos, o que deve ser apreciado à luz dos valores esperados e dos valores de controlo históricos. Nos poucos casos em que a volatilidade seja preocupante, a utilização de «selantes de placas» pode contribuir para isolar eficazmente os poços individuais durante os ensaios, sendo, por conseguinte, recomendada.
32. A repetição dos ensaios definitivos para o mesmo produto químico deve ser feita em dias diferentes, a fim de garantir a sua independência.

Ensaio da luciferase

33. Pode utilizar-se um reagente comercial de ensaio da luciferase [p. ex., Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, ou equivalente)], desde que sejam respeitados os critérios de aceitação. Os reagentes do ensaio devem ser escolhidos com base na sensibilidade do luminómetro a utilizar. Caso se recorra ao sistema de ensaio padrão da luciferase – Cell Culture Lysis Reagent (p.e., Promega, E1531 ou equivalente) –, este deve ser utilizado antes da adição do substrato. O reagente de luciferase deve ser aplicado de acordo com as instruções do fabricante.

ANÁLISE DOS DADOS

Ensaio de agonistas do ER

34. No caso do ensaio de agonistas do ER, para obter a atividade transcricional relativa para o PC (1 nM de E2), os sinais de luminescência da mesma placa podem ser analisados de acordo com os seguintes passos (também são aceitáveis outros processos matemáticos equivalentes):

Etapa 1: Calcular o valor médio para o VC.

Etapa 2: Subtrair o valor médio do VC de todos os poços, para normalizar os dados.

Etapa 3: Calcular a média para o PC normalizado.

Etapa 4: Dividir o valor normalizado de cada poço da placa pelo valor médio do PC normalizado (PC = 100 %).

O valor final de cada poço corresponde à atividade transcricional relativa desse poço em comparação com a resposta do PC.

Etapa 5: Calcular o valor médio da atividade transcricional relativa para cada grupo de concentração do produto químico em estudo. A resposta tem duas vertentes: a média da atividade transcricional (resposta) e a concentração a que ocorre a resposta (ver secção seguinte).

Considerações sobre a indução de EC₅₀, PC₅₀ e PC₁₀

35. É necessária uma curva completa concentrações-resposta para o cálculo do EC₅₀, mas isso pode nem sempre ser possível ou praticável devido às limitações da gama de concentrações do ensaio – por exemplo, devido a problemas de citotoxicidade ou de solubilidade. No entanto, como o EC₅₀ e o nível máximo de indução (correspondente ao valor mais elevado da equação de Hill) são parâmetros informativos, estes parâmetros devem ser comunicados sempre que possível. Para o cálculo do EC₅₀ e do nível máximo de indução, deve utilizar-se *software* estatístico adequado (por exemplo, o *software* Graphpad Prism). Se a equação logística de Hill for aplicável aos dados das respostas às concentrações, o EC₅₀ deverá ser calculado com recurso à seguinte equação (7):

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / \{1 + 10^{[\log(\text{EC}_{50}) - X] \times \text{curva de Hill}}\}, \text{ em que:}$$

X é o logaritmo da concentração;

Y é a resposta e o Y começa na «inferior» e vai até à superior numa curva sigmoide. A inferior é fixada em zero na equação logística de Hill.

36. Para cada produto químico em estudo, devem apresentar-se:

O RPC_{máx}, que corresponde ao nível máximo de resposta induzido pelo produto químico em estudo, expresso em percentagem da resposta induzida por 1 nM E2 na mesma placa, bem como o PC_{máx} (concentração associada ao RPC_{máx}); e

No caso de produtos químicos positivos, as concentrações que induzem o PC₁₀ e, se for caso disso, o PC₅₀.

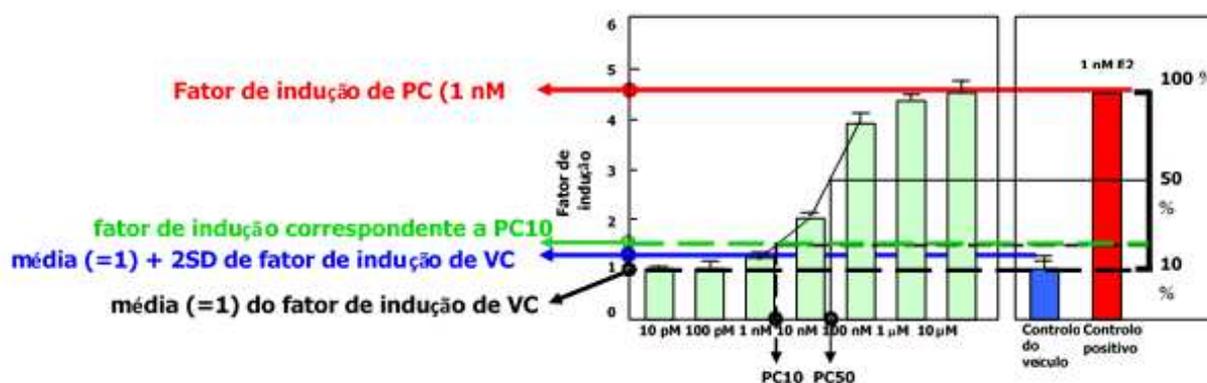
37. O valor PC_x pode ser calculado através da interpolação entre 2 pontos na coordenada X-Y, um imediatamente acima e um imediatamente abaixo de um valor PC_x. Se os pontos de dados situados imediatamente acima e abaixo do valor PC_x tiverem as coordenadas (a, b) e (c, d), respetivamente, o valor PC_x pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\log[\text{PC}_x] = \log[c] + (x-d)/(d-b).$$

38. As descrições dos valores dos PC constam da figura 1.

Figura 1

Exemplo de como calcular valores do PC. O PC (1 nM de E2) é incluído em todas as placas de ensaio



Ensaio de antagonistas do ER

39. No caso do ensaio de antagonistas do ER, para obter a atividade transcricional relativa (RTA) do pico do controlo (25 pM de E2), os sinais de luminescência da mesma placa podem ser analisados de acordo com as seguintes etapas (também são aceitáveis outros processos matemáticos equivalentes):

Etapa 1: Calcular o valor médio para o VC.

Etapa 2: Subtrair o valor médio do VC de todos os poços, para normalizar os dados. Etapa 3: Calcular a média dos picos de controlo normalizados.

Etapa 4: Dividir o valor normalizado de cada poço da placa pelo valor médio do pico do controlo normalizado (pico de controlo = 100 %).

O valor final de cada poço corresponde à atividade transcricional relativa desse poço em comparação com a resposta do pico de controlo.

Etapa 5: Calcular o valor médio da atividade transcricional relativa para cada tratamento.

Considerações de indução de IC₃₀ e IC₅₀

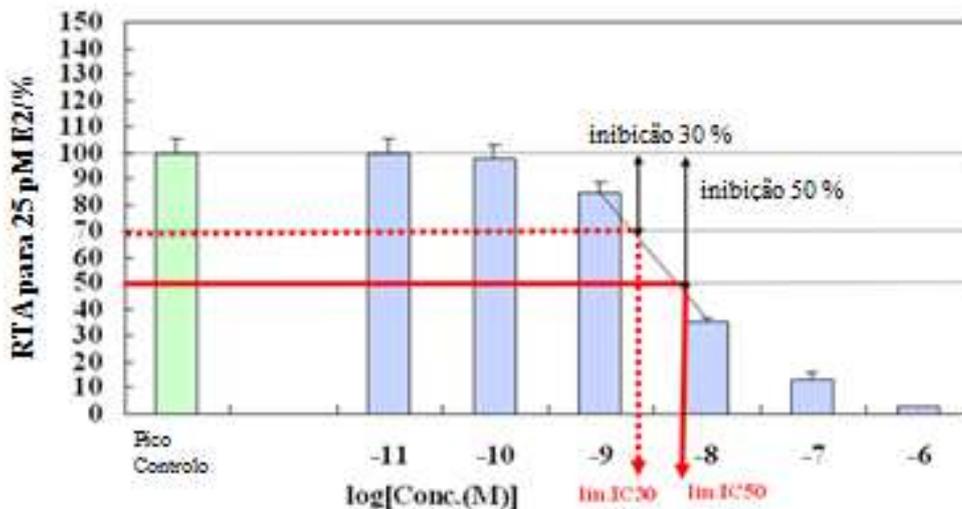
40. No caso de produtos químicos positivos, devem indicar-se as concentrações que induzem o IC₃₀ e, se for caso disso, o IC₅₀.

41. O valor IC_x pode ser calculado através da interpolação entre 2 pontos na coordenada X-Y, um imediatamente acima e um imediatamente abaixo de um valor IC_x. Se os pontos situados imediatamente acima e abaixo do valor IC_x tiverem as coordenadas (c, d) e (a, b), respetivamente, o valor IC_x pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\text{lin IC}_x = a - [b - (100 - x)] \cdot (a - c) / (b - d)$$

Figura 2

Exemplo de como calcular valores IC. O pico de controlo (25 pM de E2) está incluído em todas as placas de ensaio



RTA: atividade transcricional relativa

42. Os resultados devem basear-se em duas (ou três) séries de ensaios independentes. Se duas séries derem resultados compráveis e, por conseguinte, reproduzíveis, não é necessário realizar uma terceira série de ensaios. Para serem aceitáveis, os resultados devem:

- Cumprir os critérios de aceitabilidade (ver critérios de aceitabilidade, pontos 14-20),
- Ser reproduzíveis.

Crítérios de interpretação dos dados

Quadro 7

Crítérios de decisão positiva e negativa no ensaio de agonistas do ER

Positiva	Se o RPC _{máx} obtido for igual ou superior a 10 % da resposta do controlo positivo em, pelo menos, duas de duas ou duas de três séries de ensaios.
Negativa	Se a RPC _{máx} não atingir, pelo menos, 10 % da resposta do controlo positivo em duas de duas ou duas de três séries de ensaios.

Quadro 8

Crêterios de decisão positiva e negativa no ensaio de antagonistas do ER

Positiva	Se o IC ₃₀ for calculado em, pelo menos, duas de duas ou duas de três séries de ensaios.
Negativa	Se o IC ₃₀ não pode ser calculado em duas de duas ou duas de três séries de ensaios.

43. Os cr terios de interpreta o dos dados constam dos quadros 7 e 8. Os resultados positivos serão caracterizados pela magnitude do efeito e pela concentra o a que o efeito ocorre. Se os resultados forem expressos como uma concentra o   qual se obt m os valores de 50 % (PC₅₀) ou 10 % (PC₁₀) de PC, para o ensaio de agonistas, e 50 % (IC₅₀) ou 30 % (IC₃₀) dos valores de inibi o do pico de controlo, para o ensaio de antagonistas, estão cumpridos ambos os objetivos. No entanto, um produto químico em estudo   considerado positivo se a resposta máxima induzida pelo produto químico em estudo (RPC_{máx}) for igual ou superior a 10 % da resposta do PC em, pelo menos, duas de duas ou duas de três séries de ensaios, sendo considerado negativo se a RCP_{máx} não corresponder a, pelo menos, 10 % da resposta do controlo positivo em duas de duas ou duas de três séries de ensaios.
44. Os cálculos de PC₁₀, PC₅₀ e PC_{máx} no ensaio de agonistas do ER e de IC₃₀ e IC₅₀ no ensaio de antagonistas do ER podem ser efetuados com recurso a uma folha de cálculo disponibilizada com a *Test Guideline* no sítio Web público da OCDE ⁽²⁾.
45. Essa folha de cálculo deve ser suficiente para obter os valores de PC₁₀ ou PC₅₀ e de IC₃₀ ou IC₅₀ pelo menos duas vezes. Porém, se os dados de base resultantes para o mesmo intervalo de concentra o mostrarem variabilidade com um coeficiente de varia o (CV %) – inaceitavelmente elevado –, os dados não podem considerar-se fiáveis e importa identificar a origem da elevada variabilidade. O CV dos triplicados dos dados brutos (ou seja, os dados relativos   intensidade de luminescência) dos pontos utilizados para o cálculo do PC₁₀ deve ser inferior a 20 %.
46. O cumprimento dos cr terios de aceitabilidade indica que o sistema de ensaio está a funcionar corretamente, mas não assegura que uma determinada opera o produza dados exatos. A duplica o dos resultados da primeira série de ensaios   a melhor garantia de que foram produzidos dados exatos.
47. No caso do ensaio de agonistas do ER, em que são necessárias mais informa es para além dos fins de monitoriza o e prioriza o da presente *Test Guideline* para produtos químicos positivos, especialmente para produtos químicos PC₁₀-PC₄₉, bem como para produtos químicos suspeitos de estimular excessivamente a luciferase, pode confirmar-se que a atividade da luciferase observada   unicamente uma resposta específica do antagonista do ER , utilizando um antagonista do ER  (ver apêndice 2.1).

RELATÓRIO DO ENSAIO

48. Ver ponto 20 dos «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA».

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Recetor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1 459-1 469.
- (3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Recetor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4 252-4 263.

⁽²⁾ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

-
- (4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
 - (5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769- 71.
 - (6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-9.
 - (7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

Apêndice 2.1

FALSOS POSITIVOS: AVALIAÇÃO DE SINAIS DE LUMINESCÊNCIA NÃO MEDIADOS PELO RECETOR

1. No ensaio de agonistas do ER, podem ser gerados falsos positivos pela ativação do gene da luciferase não mediada pelo ER, pela ativação direta do produto génico ou por fluorescência independente. Esses efeitos são indicados por uma curva incompleta ou invulgar de respostas às dosagens. Se tais efeitos forem suspeitos, deve examinar-se o efeito na resposta de um antagonista do ER [por exemplo, 2-hidroxitamoxifeno (OHT) numa concentração não tóxica]. O antagonista ICI 1827 80 pode não ser adequado para este efeito, uma vez que uma concentração suficiente de ICI 1827 80 pode diminuir o valor do VC, o que irá afetar a análise dos dados.
2. Para assegurar a validade desta abordagem, é necessário ensaiar o seguinte na mesma placa:
 - Atividade agonística do produto químico desconhecido, com /sem 10 μ M de OHT
 - VC (em triplicado)
 - OHT (em triplicado)
 - 1 nM de E2 (em triplicado) como PC agonista
 - 1 nM de E2 + OHT (em triplicado)

Critérios de interpretação dos dados

Nota: Todos os poços devem ser tratados com a mesma concentração do veículo.

- Se a atividade agonística do produto químico desconhecido NÃO for afetada pelo tratamento com o antagonista do ER, este é classificado como «negativo».
- Se a atividade agonística do produto químico desconhecido for completamente inibida, devem aplicar-se os critérios de decisão.
- Se a atividade agonística na menor concentração for igual ou superior à resposta PC₁₀, o produto químico desconhecido é inibido de forma igual ou superior à resposta PC₁₀. Calcula-se a diferença das respostas dos poços não tratados e tratados com o antagonista do ER, devendo esta diferença ser considerada a resposta verdadeira, utilizada no cálculo dos parâmetros adequados para permitir uma decisão de classificação.

Análise dos dados

Verificar a norma de desempenho.

Verificar o CV entre os poços tratados nas mesmas condições.

1. Calcular a média do VC
2. Subtrair a média do VC de cada poço **não** tratado com OHT
3. Calcular a média do OHT
4. Subtrair a média do VC de cada poço tratado com OHT
5. Calcular a média do PC
6. Calcular a atividade transcricional relativa de todos os outros poços em relação ao PC.

Apêndice 2.2

PREPARAÇÃO DE SORO TRATADO COM CARVÃO REVESTIDO DE DEXTRANO (DCC)

1. O tratamento do soro com carvão revestido de dextrano (DCC) é um método geral para a remoção de compostos estrogénicos do soro que é adicionado ao meio celular, a fim de excluir a resposta distorcida associada aos estrogénios residuais no soro. Podem ser tratados com este procedimento 500 ml de soro fetal bovino (FBS).

Componentes

2. São necessários os seguintes materiais e equipamentos:

Materiais

Carvão ativado

Dextrano

Cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Sacarose

1 M de solução-tampão HEPES (pH 7,4)

Água ultrapura produzida a partir de um sistema de filtros

Equipamento

Recipiente de vidro autoclavado (a dimensão deve ser adaptada); centrífuga geral de laboratório (que pode ser regulada para uma temperatura de 4 °C)

Procedimento

3. O seguinte procedimento é ajustado para a utilização de tubos de centrifugação de 50 ml:

[Dia 1] Preparar uma suspensão de carvão revestido de dextrano com 1 l de água ultrapura contendo 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 M de sacarose, 2,5 g de carvão, 0,25 g de dextrano e 5 mM de HEPES; agitá-la a 4 °C, de um dia para o outro.

[Dia 2] Distribuir a suspensão por tubos de centrifugação de 50 ml e centrifugar a 10 000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos. Remover o sobrenadante e armazenar metade do sedimento de carvão a 4 °C para ser utilizado no dia 3. Suspender a outra metade do carvão vegetal com FBS descongelado suavemente para evitar precipitação e inativado pelo calor a 56 °C durante 30 minutos e, em seguida, transferir para um recipiente de vidro autoclavado, como um erlenmeyer. Agitar suavemente esta suspensão a 4 °C de um dia para o outro.

[Dia 3] Distribuir a suspensão com o FBS por tubos de centrifugação para centrifugação a 10 000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos. Recolher o FBS e transferi-lo para os novos sedimentos de carvão preparados e armazenados no dia 2. Suspender os sedimentos de carvão e agitar suavemente esta suspensão a 4 °C num recipiente de vidro autoclavado, de um dia para o outro.

[Dia 4] Distribuir a suspensão para centrifugação a 10 000 rpm a 4 °C por 10 minutos e esterilizar o sobrenadante por filtração através de um filtro estéril de 0,2 µm. O FBS tratado com DCC deve ser armazenado a -20 °C e pode ser utilizado durante um ano.

Apêndice 3

ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO VM7LUC PARA IDENTIFICAR OS AGONISTAS E OS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. O presente ensaio utiliza a linha celular VM7Luc4E2 ⁽¹⁾. Foi validado pelo National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (ICVAM), e pelo Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). As linhas celulares VM7Luc expressam predominantemente ER α e uma pequena quantidade de ER β endógenos (2) (3) (4).
2. O presente ensaio é aplicável a uma vasta gama de substâncias, desde que possam ser dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO; N.º CAS 67-68-5), não reajam com o DMSO ou com o meio de cultura das células e não sejam citotóxicas nas concentrações ensaiadas. Se não for possível utilizar o DMSO, pode utilizar-se outro veículo, como o etanol ou a água (ver ponto 12). O desempenho demonstrado pelo ensaio de (ant)agonistas VM7Luc ER TA sugere que os dados gerados com este ensaio podem informar sobre os mecanismos de ação mediados pelo ER e podem ser tidos em conta para a priorização de substâncias para a realização de ensaios complementares.
3. O presente ensaio foi especificamente concebido para a deteção de TA mediada por hER α e hER β , por medição da quimioluminescência como parâmetro final. A utilização de quimioluminescência em bioensaios é generalizada, em virtude da relação sinal/origem elevada. No entanto, a atividade de luciferase do pirilampo em ensaios baseados em células pode ser confundida por substâncias que inibem a enzima luciferase, causando tanto inibição aparente ou o aumento da luminescência devido à estabilização de proteínas. Além disso, em alguns ensaios de genes repórteres do ER baseados na luciferase, foram comunicados sinais de luminescência não mediados por receptores em concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 μ M, devido à sobreativação do gene repórter da luciferase. Embora a curva dose-resposta indique que a ativação real do sistema ER ocorre a concentrações inferiores, a expressão da luciferase obtida a concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de compostos semelhantes suspeitos de produzir uma sobreativação do gene repórter da luciferase idêntica à dos fitoestrogénios deve ser cuidadosamente examinada nos sistemas de ensaio de ER TA transfetados de forma estável.
4. Devem ler-se a «INTRODUÇÃO GERAL» e os «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA» antes de utilizar o presente ensaio para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio constam do apêndice 1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

5. O presente ensaio é utilizado para indicar uma ligação ao ER por ligando, seguida de uma translocação do complexo receptor-ligando ao núcleo. No núcleo, o complexo receptor-ligando fixa-se a elementos específicos de resposta do ADN e transativa o gene resposta (*luc*), o que resulta na produção da luciferase e na subsequente emissão de luz, que pode ser quantificada com o auxílio de um luminómetro. A atividade da luciferase pode ser rapidamente avaliada, de forma pouco onerosa, com uma série de conjuntos disponíveis no comércio. O VM7Luc ER TA utiliza uma linha celular do adenocarcinoma da mama humano, VM7, respondendo ao ER, que foi transfetada estavelmente com um

⁽¹⁾ Até junho de 2016, esta linha celular denominava-se linha celular BG1Luc. As células BG-1 foram originalmente descritas por Geisinger *et al.* (1998) (12) e posteriormente caracterizadas por investigadores do National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Há relativamente pouco tempo, verificou-se a existência de duas variantes das células BG-1 utilizadas pelos investigadores, BG-1 Fr e BG-1 NIEHS. Uma análise aprofundada, incluindo testes de ADN, destas duas linhas celulares BG-1, efetuada por Li *et al.* (2014) (14), revelou que a BG-1 Fr era única e que a BG-1 NIEHS – ou seja, a linha celular original utilizada para desenvolver o ensaio – não era a linha celular BG1 do carcinoma ovárico humano, mas sim uma variante da linha celular do cancro da mama humano, MCF7. A linha celular utilizada no ensaio, originalmente conhecida como BG1Luc4E2 (15), passará agora a designar-se VM7Luc4E2 («V» = variante; «M7» = células MCF7). De igual modo, o ensaio passará a designar-se VM7Luc ER TA. Embora mude a origem da linha celular em que se baseia o ensaio, tal não afeta os estudos de validação publicados nem a utilidade e aplicação do ensaio para rastreio de produtos químicos estrogénicos/antiestrogénicos.

constituente do repórter *luc* do pirilampo sob o controlo de quatro elementos de resposta estrogénicos localizados a montante do promotor do vírus do tumor mamário do rato (MMTV), para detetar substâncias com atividade agonista ou antagonista do ER *in vitro*. Este promotor de MMTV apresenta apenas uma fraca reatividade cruzada com outras hormonas esteroides e não esteroides (8). Os critérios para a interpretação dos dados são descritos em pormenor no ponto 41. Rapidamente, é identificada uma resposta positiva por uma curva concentração-resposta com, pelo menos, três pontos com barras de erro não sobrepostas (\pm DP médio), bem como uma mudança de amplitude (unidade relativa de luz [RLU] normalizada) de, no mínimo, 20 % do valor máximo para o padrão de referência (17 β -estradiol [E2; N.º CAS 50-28-2] para o ensaio de agonista, raloxifeno HCl [Ral; N.º CAS 84449-90-1]/E2 para o ensaio de antagonistas).

PROCEDIMENTO

Linha celular

6. Para o ensaio, deve utilizar-se a linha celular VM7Luc4E2 estavelmente transfetada. Na atualidade, esta linha celular apenas está disponível mediante acordo de licença técnica da Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA ⁽²⁾, e da Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, EUA ⁽³⁾.

Estabilidade da linha celular

7. Para manter a estabilidade e a integridade da linha celular, as células devem ser cultivadas durante mais de uma passagem a partir da cultura-mãe congelada em meios de manutenção de células (ver ponto 9). Estas não devem ser cultivadas por mais de 30 passagens. Para a linha celular VM7Lu4E2, 30 passagens correspondem a cerca de três meses.

Cultura celular e condições de incubação em placas

8. Devem ser seguidos os procedimentos especificados na *Guidance on Good Cell Culture Practice* [Orientações de boas práticas de cultura celular] (5) (6), para garantir a qualidade de todos os materiais e métodos, a fim de manter a integridade, a validade e a reprodutibilidade dos trabalhos realizados.
9. As células VM7Luc4E2, são mantidas num meio RPMI 1640 suplementado com 0,9 % de «pen-strep» e 8,0 % de soro fetal bovino (FBS), numa incubadora de cultura de tecidos específica, a 37 °C \pm 1 °C, 90 % \pm 5 % de humidade e 5,0 % \pm 1 % CO₂/ar.
10. Quando atingirem uma confluência de cerca de 80 %, as células VM7Luc4E2 são subcultivadas e condicionadas durante 48 horas num ambiente sem estrogénios, antes de serem colocadas em placas com 96 poços para exposição aos produtos químicos em estudo e para análise da indução dependente de estrogénios da atividade da luciferase. O meio isento de estrogénios (EFM) contém meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem vermelho de fenol, complementado com 4,5 % de FBS tratado com carvão/dextrano, 1,9 % de L-glutamina e 0,9 % de «pen-strep». Todo o material de plástico deve ser isento de atividade estrogénica [ver protocolo pormenorizado (7)].

Crítérios de aceitabilidade

11. A aceitação ou rejeição de um ensaio baseia-se na avaliação do padrão de referência e dos resultados do controlo de todas as experiências realizadas numa placa de 96 poços. Cada padrão de referência é ensaiado em várias concentrações, havendo várias amostras de cada concentração de referência e de controlo. Os resultados são comparados

⁽²⁾ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, endereço de correio eletrónico: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

⁽³⁾ Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, endereço de correio eletrónico: info@dioxins.com, telefone: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

com os controlos de qualidade (QC) para os parâmetros derivados das bases de dados agonistas e antagonistas históricos geradas por cada laboratório durante a demonstração de competência técnica. As bases de dados históricos são continuamente atualizadas com os padrões de referência e os valores de controlo. A mudança de equipamento ou das condições laboratoriais pode exigir a criação de bases de dados históricos atualizadas.

Ensaio de agonistas

Ensaio de determinação da gama

- **Indução:** A indução nas placas deve ser medida dividindo o valor médio mais elevado da unidade de luz relativa (RLU) – padrão de referência E2 – pelo valor médio RLU do controlo com DMSO. Normalmente, é atingido um nível de indução cinco vezes superior, mas, para efeitos de aceitação, a indução deve ser superior ou igual a quatro vezes.
- **Resultados do controlo com DMSO:** Os valores RLU de controlo do solvente devem ser 2,5 vezes superiores ao desvio-padrão do valor histórico do valor médio RLU do controlo do solvente histórico.
- Uma experiência que não cumpra um critério de aceitação deve ser rejeitada e repetida.

Ensaio global

Inclui critérios de aceitabilidade do ensaio de determinação da gama dos agonistas e o seguinte:

- **Resultados do padrão de referência:** A curva E2 de concentração-resposta do padrão de referência (curva concentração-resposta) deve ter uma forma sigmoideal e, no mínimo, três valores dentro da parte linear da curva concentração-resposta.
- **Resultados do controlo positivo:** Os valores RLU do controlo do metoxicloro devem ser superiores ao DMSO médio mais três vezes o desvio-padrão médio do DMSO.
- Uma experiência que não cumpra um critério de aceitação único deve ser rejeitada e repetida.

Ensaio de antagonistas

Ensaio de determinação da gama

- **Redução:** A redução na placa é medida dividindo a média do valor RLU do padrão de referência Ral/E2 mais elevado pelo valor médio RLU de controlo com DMSO. Normalmente, é atingido um nível de redução de fator cinco, mas, para efeitos de aceitação, a redução deve ser superior ou igual a um fator três.
- **Resultados do controlo E2:** Os valores RLU do controlo E2 devem situar-se no intervalo de 2,5 vezes o desvio-padrão do valor RLU histórico médio do controlo E2.
- **Resultados do controlo com DMSO:** Os valores RLU do controlo com DMSO devem situar-se no intervalo de 2,5 vezes o desvio-padrão do valor RLU histórico médio do controlo do solvente.

- Uma experiência que não cumpra um dado critério de aceitação será rejeitada e repetida.

Ensaio global

Inclui os critérios de aceitação do ensaio de determinação da gama dos antagonistas e o seguinte:

- Resultados do padrão de referência: A curva concentração-resposta do padrão de referência Ral/E2 (curva concentração-resposta) deve ter uma forma sigmoideal e, no mínimo, três valores dentro da parte linear da curva concentração-resposta.
- Resultados do controlo positivo: Os valores RLU do controlo tamoxifeno/E2 devem ser inferiores ao controlo médio E2 menos três vezes o desvio-padrão do controlo médio E2.
- Uma experiência que não cumpra um qualquer critério de aceitação será rejeitada e repetida.

Padrões de referência, controlos positivos e controlos de veículo

Controlo do veículo (ensaios de agonistas e antagonistas)

12. O veículo utilizado para dissolver os produtos químicos em estudo deve ser sujeito a ensaio de controlo. O veículo utilizado durante a validação do ensaio VM7Luc ER TA foi 1 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, N.º CAS 67-68-5) (ver ponto 24). Se for utilizado um veículo diferente do DMSO, todos os padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo devem ser ensaiados no mesmo veículo, se pertinente.

Padrão de referência (determinação de gama para agonistas)

13. O padrão de referência é o E2 (N.º CAS 50-28-2). Para os ensaios de determinação de gama, o padrão de referência é constituído por uma diluição sequencial de quatro concentrações de E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ and $2,87 \times 10^{-12}$ M), sendo cada concentração ensaiada em dois poços.

Padrão de referência (completo para agonistas)

14. O E2 para um ensaio completo resulta de uma diluição em série de 1:2 constituída por 11 concentrações (de $3,67 \times 10^{-10}$ a $3,59 \times 10^{-13}$ M) de E2 em dois poços.

Padrão de referência (determinação de gama para antagonistas)

15. O padrão de referência é uma combinação de Ral (N.º CAS 84449-90-1) e E2 (N.º CAS 50-28-2). O RAL/E2 para a realização de ensaios de determinação de gama resulta de uma diluição em série de três concentrações de Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ e $1,92 \times 10^{-10}$ M) mais uma concentração fixa ($9,18 \times 10^{-11}$ M) de E2 em dois poços.

Padrão de referência (completo para antagonistas)

16. O RAL/E2 de ensaio completo consiste numa diluição em série de 1:2 de Ral (de $2,45 \times 10^{-8}$ a $9,57 \times 10^{-11}$ M) mais uma concentração fixa ($9,18 \times 10^{-11}$ M) de Ral/E2 constituída por nove concentrações de Ral/E2 em dois poços.

Controlo positivo fraco (agonistas)

17. O controlo positivo fraco é uma solução $9,06 \times 10^{-6}$ M p,p'-metoxicloro (metoxicloro; N.º CAS 72-43-5) em EFM.

Controlo positivo fraco (antagonista)

18. O controlo positivo fraco é tamoxifeno (N.º CAS 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M com $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 em EFM.

Controlo E2 (ensaio para antagonistas)

19. O controlo E2 é $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 em EFM, sendo utilizado como controlo negativo de base.

Fator de indução (agonistas)

20. A indução da atividade da luciferase do padrão de referência (E2) é medida dividindo o valor RLU médio mais elevado do padrão de referência E2 pelo valor RLU do controlo com DMSO médio, devendo o resultado ter um fator superior a quatro.

Fator de redução (antagonistas)

21. A atividade média da luciferase do padrão de referência (Ral/E2) é medida dividindo o valor RLU médio mais elevado do padrão de referência Ral/E2 pelo valor médio do DMSO, devendo ser superior ao triplo.

Demonstração de competência técnica do laboratório (ver ponto 14 e quadros 3 e 4 da secção «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA» do presente método de ensaio)

Veículo

22. Os produtos químicos em estudo devem ser dissolvidos num solvente que os solubilize e ser miscíveis com o meio celular. A água, o etanol (95 % a 100 % de pureza) e o DMSO são veículos adequados. Caso seja utilizado DMSO, o seu teor não deve exceder 1 % (v/v). Para qualquer veículo, deve demonstrar-se que o volume máximo utilizado não é citotóxico e não interfere com a eficácia do ensaio. Os padrões de referência e os controlos são dissolvidos em 100 % de solvente e, em seguida, diluídos em concentrações adequadas em EFM.

Preparação dos produtos químicos em estudo

23. Os produtos químicos em estudo são dissolvidos em DMSO a 100 % (ou solvente adequado) e, em seguida, diluídos em concentrações adequadas. Antes de serem dissolvidos e diluídos, todos os produtos químicos em estudo devem estar à temperatura ambiente. As soluções do produto químico em estudo devem ser preparadas de novo para cada experiência. As soluções não devem ter precipitados ou turbidez perceptíveis. Os padrões de referência e as culturas de controlo podem preparar-se a granel; contudo, o padrão de referência, as diluições de controlo e os produtos químicos em estudo finais devem ser preparados para cada experiência e utilizados nas 24 horas seguintes à preparação.

Solubilidade e citotoxicidade: considerações para a determinação da gama

24. O ensaio de determinação da gama é composto por sete pontos — diluições em série de 1:10 realizadas em duplicado. Inicialmente, os produtos químicos são ensaiados até à concentração máxima de 1 mg/ml (~1 mM), para o ensaio de agonistas, e 20 µg/ml (~10 M), para o ensaio de antagonistas. As experiências de determinação da gama são utilizadas para determinar o seguinte:

- Concentrações iniciais do produto químico em estudo a utilizar durante os ensaios completos
- Diluições do produto químico em estudo (1:2 ou 1:5) a utilizar durante os ensaios completos

25. Os protocolos dos ensaios de agonistas e antagonistas (7) incluem uma avaliação da viabilidade/citotoxicidade celular, integrada nas determinações da gama e nos ensaios completos. O método de citotoxicidade que foi usado para avaliar a viabilidade celular durante a validação do VM7Luc ER TA (1) é um método qualitativo de observação visual graduado; no entanto, é possível utilizar um método quantitativo para a determinação da citotoxicidade - ver protocolo (7). Não podem utilizar-se dados de concentrações de produtos químicos em estudo que causem uma redução da viabilidade superior a 20 %.

Exposição ao produto químico em estudo e organização das placas do ensaio

26. As células são contadas e colocadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços (2×10^5 células por poço) em EFM e incubadas durante 24 horas, para permitir que as células se fixem à placa. O EFM é removido e substituído pelos produtos químicos em estudo e de referência em EFM, incubados durante 19-24 horas. É necessário prestar especial atenção às substâncias altamente voláteis, porquanto os poços de controlo mais próximos podem gerar resultados falsos positivos. Nesses casos, a utilização de «selantes de placas» permite isolar eficazmente os poços individuais durante os ensaios, sendo, por conseguinte, recomendada.

Ensaio de determinação da gama

27. O ensaio de determinação da gama utiliza todos os poços da placa de 96 poços para ensaiar até seis produtos químicos em estudo em sete diluições em série 1:10 em duplicado (ver [figuras 1 e 2](#)).
- O ensaio de determinação da gama para agonistas utiliza quatro concentrações de E2 em duplicado como padrão de referência e quatro poços replicados para o controlo com DMSO.
 - O ensaio de determinação da gama para agonistas utiliza três concentrações de Ral/E2 com $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 em duplicado como padrão de referência, com três poços replicados para os controlos com E2 e DMSO.

Figura 1

Configuração da placa de 96 poços para o ensaio de determinação da gama para agonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abreviaturas: E2-1 a E2-4 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do padrão de referência E2; TC1-1 a TC1-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 1 (TC1); TC2-1 a TC2-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 2 (TC2); TC3-1 a TC3-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 3 (TC3); TC4-1 a TC4-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 4 (TC4); TC5-1 a TC5-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 5 (TC5); TC6-1 a TC6-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 6 (TC6); VC = controlo do veículo (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Figura 2

Configuração da placa de 96 poços para o ensaio de determinação da gama para antagonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abreviaturas: E2= controlo E2; Ral-1 a Ral-3 = concentrações do padrão de referência raloxifeno/E2 (da mais alta para a mais baixa); TC1-1 a TC1-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 1 (TC1); TC2-1 a TC2-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 2 (TC2); TC3-1 a TC3-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 3 (TC3); TC4-1 a TC4-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 4 (TC4); TC5-1 a TC5-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 5 (TC5); TC6-1 a TC6-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 6 (TC6); VC = controlo do veículo = (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Todos os produtos químicos em estudo são ensaiados na presença de $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. O volume final recomendado de meio necessário para cada poço é de 200 µl. Utilizar apenas as placas de ensaio em que as células de todos os poços tiverem uma viabilidade igual ou superior a 80 %.
29. A determinação das concentrações iniciais do ensaio completo para agonistas é descrita pormenorizadamente no respetivo protocolo (7). Em síntese, utilizam-se os seguintes critérios:
- Se não houver pontos na curva de concentração do produto químico em estudo superiores à média mais três vezes o desvio-padrão do controlo com DMSO, os ensaios completos devem ser efetuados com uma diluição em série de 1:2 em 11 pontos a partir da concentração máxima solúvel.
 - Se existirem pontos na curva de concentração do produto químico em estudo superiores à média mais três vezes o desvio-padrão do controlo com DMSO, a concentração inicial a utilizar para diluição em 11 pontos em ensaios completos deve ser uma unidade logarítmica mais elevada do que a concentração com que se obtém o valor RLU ajustado mais elevado na determinação da gama. O esquema de diluição de 11 pontos deve basear-se nas diluições de 1:2 ou de 1:5, de acordo com os seguintes critérios:

Utilizar uma diluição em série de 1:2 em 11 pontos se a gama de concentrações resultante abranger toda a gama de respostas com base na curva concentração-resposta gerada no ensaio de determinação da gama. Caso contrário, utilizar uma diluição de 1:5.
 - Se o produto químico em estudo apresentar uma curva de resposta à concentração bifásica no ensaio de determinação da gama de concentrações, ambas as fases devem também ser resolvidas no ensaio completo.
30. A determinação das concentrações iniciais para os ensaios completos para **antagonistas** é descrita pormenorizadamente no respetivo protocolo (7). Em síntese, utilizam-se os seguintes critérios:
- Se não existirem pontos da curva de concentração do produto químico em estudo inferiores à média menos o triplo do desvio-padrão do E2, deve efetuar-se um ensaio completo do controlo com uma diluição em série de 1:2 em 11 pontos com início na concentração máxima solúvel.

— Se existirem pontos na curva de concentrações do produto químico em estudo à média menos o triplo do desvio-padrão do E2, a concentração inicial a utilizar no esquema de diluição em 11 pontos em ensaios completos deve ser uma das seguintes:

- A concentração com que se obtém o mais baixo valor RLU ajustado na determinação da gama;
- A máxima concentração solúvel [ver protocolo relativo aos antagonistas (7), figura 14-2];
- A mais baixa concentração citotóxica [ver protocolo relativo aos antagonistas (7), figura 14-3 para um exemplo conexo].

— O esquema de diluição em 11 pontos terá como base uma série de diluições de 1:2 ou 1:5, ou uma diluição de acordo com os seguintes critérios:

Utilizar uma diluição em série de 1:2 em 11 pontos se a gama de concentrações resultante abranger toda a gama de respostas, com base na curva concentração-resposta gerada no ensaio de determinação da gama. Caso contrário, utilizar uma diluição de 1:5.

Ensaio completos

31. Os ensaios completos consistem em diluições em série em 11 pontos (diluições em série de 1:2 ou 1:5 com base na concentração inicial dos critérios para ensaios completos), sendo cada concentração ensaiada em três poços da placa de 96 poços (ver figuras 3 e 4).

— Os ensaios completos para *agonistas* utilizam 11 concentrações de E2 em duplicado como padrão de referência. São incluídos em cada placa quatro poços replicados para o controlo com DMSO e quatro poços replicados para o controlo com metoxicloro ($9,06 \times 10^{-6}$ M);

— Os ensaios completos para *antagonistas* utilizam 9 concentrações de Ral/E2 com $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 em duplicado como padrão de referência com quatro poços replicados para o controlo E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M, quatro poços replicados para os controlos com DMSO e quatro poços replicados para tamoxifeno $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Figura 3

Configuração da placa de 96 poços para o ensaio completo para agonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Abreviaturas: TC11-1 a TC1-11 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 1; 1 TC2-1 a TC2-11 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 2; E2-1 a E2-11 = concentrações do padrão de referência E2 (da mais alta para a mais baixa); Met = controlo positivo fraco do *p,p'*- metoxicloro; VC = DMSO (1 % v/v) do controlo do veículo EFM

Figura 4

Configuração da placa de 96 poços para o ensaio completo para antagonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abreviaturas: E2 = controlo E2; Ral-1 a Ral-9 = concentrações do padrão de referência raloxifeno/E2 (da mais alta para a mais baixa); Tam = controlo positivo fraco tamoxifeno/E2; TC1-1 a TC1-11 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico 1 (TC1); TC2-1 a TC2-11 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 2 (TC2); VC = controlo do veículo (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Tal como referido, todos os poços de referência e de ensaio contêm uma concentração fixa de E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M)

32. As repetições dos ensaios completos para o mesmo produto químico devem ser realizadas em dias diferentes, a fim de garantir a sua independência. Devem efetuar-se, pelo menos, dois ensaios completos. Se os seus resultados forem contraditórios (por exemplo, um ensaio é positivo, o outro negativo) ou se um dos ensaios for inadequado, deve realizar-se um terceiro ensaio.

Medição da luminescência

33. A luminescência é medida na gama de 300 a 650 nm, com um luminómetro de injeção e *software* de controlo do volume de injeção e do intervalo de medição (7). A emissão de luz de cada poço é expressa em RLU por poço.

ANÁLISE DOS DADOS**Determinação de EC_{50} / IC_{50}**

34. Os valores EC_{50} (metade da concentração efetiva máxima de um produto químico em estudo [agonistas]) e IC_{50} (metade da concentração inibitória de um produto químico em estudo [antagonistas]) são determinados a partir dos dados concentração-resposta. Para produtos químicos em estudo positivos em uma ou mais concentrações, a concentração que provoca uma resposta semimáxima (IC_{50} ou EC_{50}) é calculada com recurso a uma análise funcional de Hill ou a uma alternativa adequada. A análise de Hill é um modelo matemático logístico de quatro parâmetros, que relaciona a concentração do produto químico em estudo com a resposta (geralmente após uma curva sigmoidal), utilizando a equação seguinte:

$$Y = Base + \frac{(Topo - Base)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Declive}}$$

em que:

Y= resposta (i.e., RLU);

X= o logaritmo de concentração;

Base= a resposta mínima;

Topo= a resposta máxima;

$\text{Log}(EC_{50})$ [ou $\text{log}(IC_{50})$]= o logaritmo de X como resposta intermédia entre o topo e a base;

Curva de Hill= o declive da curva.

O modelo calcula o valor mais adequado para o topo, a base, a curva de Hill e os parâmetros IC_{50} e EC_{50} . Para o cálculo dos valores de EC_{50} e IC_{50} , deve utilizar-se um *software* estatístico adequado (por exemplo, Graphpad Prism®).

Determinação de anomalias

35. Uma boa avaliação estatística pode ser facilitada pela inclusão (sem carácter limitativo) do ensaio-Q – ver protocolos relativos aos agonistas e antagonistas (7) –, para determinar os poços «inutilizáveis», a excluir da análise de dados.
36. Para os replicados do padrão de referência E2 (amostra de dois), qualquer valor RLU ajustado para um replicado a uma dada concentração de E2 é considerado anormal se o seu valor for superior ou inferior em mais de 20 % ao valor RLU ajustado para essa concentração, que consta da base de dados históricos.

Recolha e ajustamento dos dados do luminómetro para determinação da gama

37. Os dados brutos do luminómetro devem ser transferidos para um modelo de folha de cálculo concebida para o ensaio. Deve determinar-se se há pontos aberrantes que necessitem de ser excluídos (ver critérios de aceitação do ensaio para parâmetros determinados nas análises). Devem efetuar-se os cálculos a seguir indicados:

Agonistas

Etapa 1 Calcular o valor médio para o controlo do veículo (VC) DMSO

Etapa 2 Subtrair o valor médio do VC DMSO do valor de cada poço, a fim de normalizar os dados.

Etapa 3 Calcular o fator de indução médio para o padrão de referência (E2).

Etapa 4 Calcular o valor médio de EC_{50} para os produtos químicos em estudo.

Antagonistas

Etapa 1 Calcular o valor médio do VC DMSO.

Etapa 2 Subtrair o valor médio do VC DMSO do valor de cada poço, a fim de normalizar os dados.

Etapa 3 Calcular o fator de redução médio para o padrão de referência (Ral/E2).

Etapa 4 Calcular o valor médio do padrão de referência E2.

Etapa 5 Calcular o valor médio de IC_{50} para os produtos químicos em estudo.

Recolha e ajustamento dos dados do luminómetro para o ensaio global

38. Os dados brutos do luminómetro devem ser transferidos para um modelo de folha de cálculo concebida para o ensaio. Deve determinar-se se há pontos aberrantes que necessitem de ser excluídos (ver critérios de aceitação do ensaio para parâmetros determinados nas análises). Efetuam-se os seguintes cálculos:

Agonistas

Etapa 1 Calcular o valor médio do VC DMSO.

Etapa 2 Subtrair o valor médio do VC DMSO do valor de cada poço, a fim de normalizar os dados.

Etapa 3 Calcular o fator de indução médio para o padrão de referência (E2).

Etapa 4 Calcular o valor médio de EC_{50} para E2 e para os produtos químicos em estudo.

Etapa 5 Calcular o valor RLU ajustado médio para o metoxicloro.

Antagonistas

Etapa 1 Calcular o valor médio do VC DMSO.

Etapa 2 Subtrair o valor médio do VC DMSO do valor de cada poço, a fim de normalizar os dados.

Etapa 3 Calcular o fator de indução médio para o padrão de referência (Ral/E2).

Etapa 4 Calcular o valor médio de IC_{50} para Ral/E2 e para os produtos químicos em estudo.

Etapa 5 Calcular o valor RLU ajustado médio para o tamoxifeno.

Etapa 6 Calcular o valor médio do padrão de referência E2.

Critérios de interpretação dos dados

39. O VM7Luc ER TA destina-se a fazer parte de uma abordagem de ponderação das provas que contribuirá para priorizar substâncias para ensaios de ED *in vivo*. Uma parte deste procedimento de priorização consiste na classificação do produto químico em estudo como positivo ou negativo em termos de atividade agonista ou de atividade antagonista. Os critérios de decisão positiva e negativa utilizados no estudo de validação da VM7Luc ER TA são descritos no quadro 1.

Quadro 1

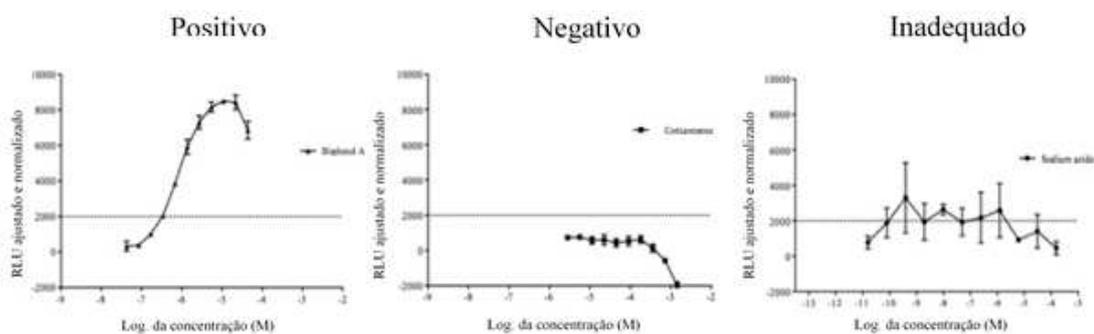
Critérios de decisão positivos e negativos

ATIVIDADE AGONISTA	
Positiva	<ul style="list-style-type: none"> — Todos os produtos químicos em estudo classificados como <i>positivo para a</i> atividade agonista do ER devem apresentar uma curva concentração-resposta que consista numa linha de base, seguida de uma inclinação positiva que termina num plano ou num pico. Em alguns casos, apenas duas destas características (linha de base–inclinação ou inclinação–pico) podem ser definidas. — A linha que define a inclinação positiva deve conter, pelo menos, três pontos com barras de erro não sobrepostas ($DP \pm$média). Excluem-se os pontos que constituem a linha de base, mas a parte linear da curva pode incluir o pico ou o primeiro ponto do plano. — Uma classificação positiva requer uma amplitude de resposta, ou seja, a diferença entre a linha de base e o pico, de, pelo menos, 20 % do valor máximo para o padrão de referência E2 (i.e., 2000 RLU ou mais, se o valor máximo de resposta dos padrões de referência [E2] for ajustado para 10000 RLU). — Se possível, deve calcular-se um valor EC_{50} para cada produto químico em estudo positivo.
Negativa	O valor RLU ajustado médio para uma dada concentração é igual ou inferior ao valor RLU médio do controlo com DMSO mais três vezes o desvio-padrão do RLU do DMSO.
Inadequada	Os dados que não possam ser interpretados como válidos para demonstrar a presença ou ausência de atividade, devido a limitações qualitativas ou quantitativas importantes, são considerados inadequados e não podem ser utilizados para determinar se o produto químico é positivo ou negativo. Os produtos químicos em causa devem ser objeto de novo ensaio.
ATIVIDADE ANTAGONISTA	
Positiva	<ul style="list-style-type: none"> — Os dados do produto químico em estudo produzem uma curva concentração-resposta que consiste numa linha de base seguida de uma inclinação negativa. — A linha que define a inclinação negativa deve ter, pelo menos, três pontos com barras de erro não sobrepostas; os pontos que formam a linha de base são excluídos, mas a parte linear da curva pode incluir o primeiro ponto do plano. — Deve registar-se, pelo menos, uma redução de 20 % na atividade do valor máximo do padrão de referência Ral/E2 (i.e., 8000 RLU ou menos, quando o valor máximo da resposta do padrão de referência [Ral/E2] é ajustado para 10000 RLU). — As concentrações não citotóxicas mais elevadas do produto químico em estudo devem ser iguais ou inferiores a 1×10^{-5} M. — Se possível, deve calcular-se um valor IC_{50} para cada produto químico em estudo positivo.
Negativa	Todos os pontos de dados são acima do valor EC_{80} (80 % da resposta de E2 ou 8000 RLU), em concentrações inferiores a $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Inadequada	Os dados que não possam ser interpretados como válidos para demonstrar a presença ou ausência de atividade devido a limitações qualitativas ou quantitativas importantes são considerados inadequados e não podem ser utilizados para determinar se o produto químico é positivo ou negativo. O produto químico em causa deve ser objeto de novo ensaio.

40. Sempre que possível, os resultados positivos serão caracterizados pela magnitude do efeito e pela concentração a que este ocorre. Nas figuras 5 e 6, apresentam-se exemplos de dados positivos, negativos e inadequados.

Figura 5

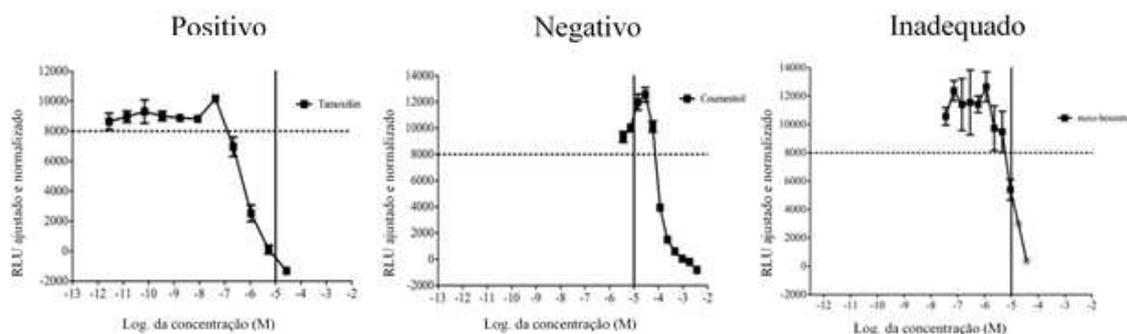
Exemplos de agonistas: Dados positivos, negativos e inadequados



A linha a tracejado indica 20 % da resposta do E2, 2000 RLU ajustados e normalizados.

Figura 6

Exemplos de antagonistas: Dados positivos, negativos e inadequados



A linha a tracejado indica 80 % da resposta de Ral/E2, 8000 RLU ajustados e normalizados.

A linha contínua indica $1,00 \times 10^{-5}$ M. Para uma resposta ser considerada positiva, deve ser inferior à linha de 8000 RLU e em concentrações inferiores a $1,00 \times 10^{-5}$ M.

As concentrações marcadas com asterisco no gráfico do meso-hexesterol indicam pontuações de viabilidade iguais ou superiores a «2».

Os resultados do ensaio para o meso-hexesterol são considerados inadequados porque a única resposta que está abaixo de 8000 RLU ocorre a $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Os cálculos de EC_{50} e IC_{50} podem ser feitos por recurso a uma função de Hill de quatro parâmetros (para mais informações, ver protocolo relativo aos agonistas e antagonistas) (7). O cumprimento dos critérios de aceitabilidade indica que o sistema está a funcionar corretamente, mas não assegura que uma determinada série de ensaios produz dados exatos. A duplicação dos resultados da primeira série de ensaios é a melhor garantia de que foram produzidos dados exatos (ver ponto 19 da secção «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA»).

RELATÓRIO DO ENSAIO

42. Ver ponto 20 dos «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA».

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): p. 270-273.
- (6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: p. 261-287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
- (8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*,13(1):67-82.
- (9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-69.
- (10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*,17(6):646-57.
- (11) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*,139(10):4252-63.

-
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
 - (13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
 - (14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
 - (15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

*Apêndice 4*ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO DE RECEPTOR- α DE ESTROGÉNIO HUMANO ESTAVELMENTE TRANSFETADO PARA DETEÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÉNICA AGONISTA E ANTAGONISTA NOS PRODUTOS QUÍMICOS COM RECURSO À LINHA CELULAR ER α CALUX

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. O ensaio de transativação do ER α CASX utiliza a linha celular humana U2OS para detetar atividade estrogénica agonista e antagonista mediada através do receptor alfa de estrogénio humano (hER α). O estudo de validação do bioensaio do ER α CALUX estavelmente transfetado pela BioDetection Systems BV (Amesterdão, Países Baixos) demonstrou a adequação e a fiabilidade do ensaio para o fim a que se destina (1). A linha celular ER α CALUX expressa apenas ER α humano transfetado de forma estável (2) (3).
2. Este ensaio foi especificamente concebido para detetar a transativação mediada pelo hER α tendo a medição da bioluminescência como parâmetro. A utilização da bioluminescência é habitualmente utilizada nos bioensaios devido à elevada relação sinal/ruído (4).
3. Foram comunicadas concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 μ M que sobreativam o gene repórter da luciferase, o que resultou em luminescência não mediada pelo receptor (5) (6) (7). Por conseguinte, concentrações mais elevadas de fitoestrogénios ou de outros compostos semelhantes que podem sobreativar a expressão da luciferase devem ser cuidadosamente examinadas nos ensaios de transativação em ER transfetados de forma estável (ver apêndice 2).
4. Devem ler-se a «INTRODUÇÃO GERAL» e os «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA» antes de utilizar este ensaio para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice 1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

5. O bioensaio é utilizado para avaliar a ligação do ligando ao ER e subsequente translocação do complexo receptor-ligando para o núcleo. No núcleo, o complexo receptor-ligando fixa-se a elementos de resposta específicos do ADN e transativa um gene repórter da luciferase do pirilampo, que provoca um aumento da expressão celular da enzima luciferase. Após a adição do substrato luciferina da luciferase, a luciferina é transformada num produto bioluminescente. A luz produzida pode ser facilmente detetada e quantificada com o auxílio de um luminómetro.
6. O sistema de ensaio utiliza células ER α CALUX transfetadas de forma estável. As células ER α CALUX são provenientes da linha celular U2OS do osteossarcoma osteoblástico humano. As células humanas U2OS foram estavelmente transfetadas com 3xHRE-TATA-Luc e pSG5-neo-hER α pelo método de coprecipitação com fosfato de cálcio. A linha celular U2OS foi selecionada como a melhor candidata a funcionar como linha celular repórter que responde a estrogénios (e a outras hormonas esteroides), com base na observação de que revelou pouca ou nenhuma atividade recetora endógena. A ausência de recetores endógenos foi avaliada com recurso unicamente a repórteres da luciferase plasmídeos, que não revelaram nenhuma atividade após a adição de ligandos aos recetores. Além disso, esta linha celular suportou respostas fortes mediadas por hormonas quando foram transitoriamente introduzidos recetores cognatos (2) (3) (8).
7. O ensaio de produtos químicos para atividade estrogénica ou antiestrogénica com recurso à linha celular ER α CALUX inclui uma várias séries de ensaios completas. Durante a série de ensaios de avaliação prévia, são determinadas a solubilidade, a citotoxicidade e uma gama de concentrações mais pormenorizada dos produtos químicos em estudo, com vista à realização de ensaios completos. Durante as séries completas, as gamas de concentração mais pormenorizada dos produtos químicos em estudo são ensaiadas nos bioensaios ER α CALUX, seguidas da classificação dos produtos químicos em estudo para agonismo ou antagonismo.

- Os critérios para a interpretação dos dados são descritos em pormenor no ponto 59. Em suma, um produto químico em estudo é considerado positivo para agonismo se, pelo menos, duas concentrações consecutivas do produto apresentarem uma resposta igual ou superior a 10 % da resposta máxima do padrão de referência, 17 β -estradiol (PC₁₀). Um produto químico em estudo é considerado positivo para antagonismo se, pelo menos, duas concentrações consecutivas do produto químico em estudo apresentarem uma resposta igual ou inferior a 80 % da resposta máxima do padrão de referência, tamoxifeno (PC₈₀).

PROCEDIMENTO

Linhas celulares

- Para o ensaio, deve ser utilizada a linha celular U2OS ER α CALUX transfetada de forma estável. A linha celular pode ser obtida na BioDetection Systems BV, Amesterdão, Países Baixos, através de um acordo de licença técnica.
- Devem utilizar-se apenas culturas de células livres de micoplasmas. Os lotes de células utilizados devem ser certificados como negativos para contaminação por micoplasmas ou deve proceder-se à realização de um ensaio de micoplasmas antes da sua utilização. Deve usar-se a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) para deteção sensível de infeção por micoplasmas (9).

Estabilidade da linha celular

- Para manter a sua estabilidade e integridade, as células CALUX devem ser armazenadas em azoto líquido (-80 °C). Após o descongelamento para iniciar uma nova cultura, as células devem ser subcultivadas, pelo menos, duas vezes antes de serem utilizadas para avaliar a atividade estrogénica agonista e antagonista dos produtos químicos. As células não devem ser subcultivadas por mais de 30 passagens.
- Para monitorizar a estabilidade da linha celular ao longo do tempo, deve verificar-se a capacidade de resposta do sistema de ensaio agonístico e antagonístico, através da avaliação do EC₅₀ ou do IC₅₀ do padrão de referência. Além disso, é necessário monitorizar a indução relativa da amostra de controlo positivo (PC) e da amostra de controlo negativo (NC). Os resultados devem estar de acordo com os critérios de aceitação para o bioensaio ER α CALUX antagonístico (quadro 3C) ou antagonístico (quadro 4C). Os padrões de referência e os controlos positivo e negativo são apresentados no quadros 1 e no quadro 2 para os modos agonístico e antagonístico, respetivamente.

Cultura celular e condições de colocação em placa

- As células U2OS são cultivadas em meio de crescimento (DMEM/F12 (1:1) com vermelho de fenol (indicador de pH), complementado com soro fetal bovino (7,5 %), aminoácidos não essenciais (1 %), 10 unidades/ml de penicilina, estreptomicina e geneticina (G-418), marcadores de seleção. As células devem ser colocadas numa incubadora de CO₂ (5 % de CO₂) a 37 °C e com 100 % de humidade. Quando atingirem uma confluência de 85-95 %, devem ser subcultivadas ou preparadas para sementeira em placas de microtitulação com 96 poços. Neste último caso, devem ser ressuspensas em 1 × 10⁵ células/ml em meio de ensaio isento de estrogénio – DMEM/F12 (1:1) sem vermelho de fenol, complementado com soro fetal bovino tratado com carvão revestido de dextrano (5 % v/v), aminoácidos não essenciais (1 % v/v) e 10 unidades/ml de penicilina e estreptomicina) e colocadas nos poços das placas de microtitulação de 96 poços (100 μ l de suspensão celular homogeneizada). As células devem ser pré-incubadas numa incubadora de CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100 % de humidade) durante 24 horas antes da exposição. O material de plástico deve ser isento de estrogénio.

Crítérios de aceitabilidade

- As atividades agonísticas e antagonistas do(s) produto(s) químico(s) em estudo são ensaiadas em série de ensaios. Uma série de ensaios é constituída por um máximo de 6 placas de microtitulação. Cada série de ensaios contém pelo menos 1 série completa de diluições de um padrão de referência, uma amostra de controlo positivo, uma amostra de controlo negativo e solvente. As figuras 1 e 2 apresentam a configuração das placas para as séries de ensaios agonísticas e antagonísticas.

15. Todas as diluições dos padrões de referência, dos produtos químicos em estudo, dos controlos do solvente e dos controlos positivo e negativo devem ser analisadas em triplicado. Todas as análises em triplicado devem satisfazer os requisitos indicados nos quadros 3A e 4A.
16. Em cada série de ensaios, é medida, na primeira placa, uma série completa de diluições do padrão de referência (17 β -estradiol para agonismo; tamoxifeno para antagonismo). Para ser possível comparar os resultados da análise das restantes 5 microplacas com a primeira placa de microtitulação – que tem a curva concentração-resposta completa do padrão de referência –, todas as placas deverão conter 3 amostras de controlo: controlo do solvente, a mais elevada concentração do padrão de referência ensaiado e a concentração aproximada de EC₅₀ (agonismo) ou IC₅₀ (antagonismo) do padrão de referência. O rácio da média das amostras de controlo na primeira placa e das 5 restantes deve cumprir os requisitos indicados no quadro 3C (agonismo) ou no quadro 4C (antagonismo).
17. Para cada placa de microtitulação de série de ensaios, calcula-se o fator z (10) utilizando as respostas à concentração mais elevada e mais baixa do padrão de referência. Uma placa de microtitulação é considerada válida se preencher os requisitos constantes do quadro 3C (agonismo) ou do quadro 4C (antagonismo).
18. O padrão de referência deve produzir uma curva sigmoidal dose-resposta. Os EC₅₀ ou IC₅₀ derivados da resposta da série de diluições do padrão de referência devem cumprir os requisitos indicados no quadro 3C (agonismo) ou no quadro 4C (antagonismo).
19. Cada série de ensaios deve abranger uma amostra de controlo positivo e uma amostra de controlo negativo. A indução relativa calculada da amostra de controlo positivo e da amostra de controlo negativo deve satisfazer os requisitos indicados no quadro 3C (agonismo) ou no quadro 4C (antagonismo).
20. Durante todas as medições, o fator de indução da mais elevada concentração do padrão de referência deve ser medido dividindo a resposta média da unidade de luz relativa (RLU) mais elevada do padrão de referência, 17 β -estradiol, pela resposta de controlo RLU média do solvente de referência. Este fator de indução deve cumprir os requisitos mínimos relativos ao fator de indução prescrito no quadro 3C (agonismo) ou no quadro 4C (antagonismo).
21. Só são consideradas válidas as placas de microtitulação que satisfaçam todos os critérios de aceitação acima mencionados e possam ser utilizadas para avaliar a resposta do produto químico em estudo.
22. Os critérios de aceitação são aplicáveis tanto a séries de ensaios prévios como a séries de ensaios completas.

Quadro 1

Concentrações do padrão de referência, controlo positivo (PC) e controlo negativo (NC) para o bioensaio agonístico CALUX

	Substância	N.º CAS	Intervalo de ensaio (M)
Padrão de referência	17 β -Estradiol	50-28-2	1*10 ⁻¹³ - 1*10 ⁻¹⁰
Controlo positivo (PC)	17 α -Metiltestosterona	58-18-4	3*10 ⁻⁰⁶
Controlo negativo (NC)	Corticosterona	50-22-6	1*10 ⁻⁰⁸

Quadro 2

Concentrações do padrão de referência, controlo positivo (PC) e controlo negativo (NC) para o bioensaio antagonístico CALUX

	Substância	N.º CAS	Intervalo de ensaio (M)
Padrão de referência	Tamoxifeno	10540-29-1	$3 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-5}$
Controlo positivo (PC)	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	$1 \cdot 10^{-9}$
Controlo negativo (NC)	Resveratrol	501-36-0	$1 \cdot 10^{-5}$

Quadro 3

CrITÉrios de aceitação para o bioensaio agonístico ER α CALUX

A - amostras individuais numa placa		CrITÉrio
1	% DP máximo dos poços triplicados (para NC, PC, cada diluição do produto químico em estudo e o padrão de referência, exceto C0)	< 15 %
2	% DP máximo dos poços triplicados [para o padrão de referência e para os controlos do solvente do produto químico em estudo (C0, SC)]	< 30 %
3	Fuga máxima de LDH, como medida de citotoxicidade.	< 120 %
B - numa única placa de microtitulação		
4	Relação entre o controlo do solvente do padrão de referência (C0; placa 1) e o controlo do solvente do produto químico em estudo (SC; placas 2 a x),	0,5 a 2,0
5	Relação entre as concentrações mais elevadas aprox. de EC ₅₀ e do padrão de referência na placa 1 e as concentrações mais elevadas aprox. de EC ₅₀ e do padrão de referência nas placas 2 a x (C4, C8)	0,70 a 1,30
6	Fator Z de cada placa	> 0,6
C - numa única série de análises (todas as placas de uma série)		
7	Curva sigmoidal dos padrões de referência	Sim (17 β -estradiol)
8	Gama EC ₅₀ para o padrão de referência (17 β -estradiol)	$4 \cdot 10^{-12}$ – $4 \cdot 10^{-11}$ M
9	Fator de indução mínimo da concentração mais elevada de 17 β -estradiol, em relação ao controlo de solvente do padrão de referência.	5
10	(%) PC indução relativa.	> 30 %
11	(%) NC indução relativa	< 10 %

Aprox.: aproximado; PC: controlo positivo; NC: controlo negativo; SC: controlo de solvente do produto químico em estudo; C0: controlo de solvente do padrão de referência; DP: desvio-padrão; DHL: desidrogenase láctica

Quadro 4

Critérios de aceitação para o bioensaio antagonístico ER α CALUX

A - amostras individuais numa placa		Critério
1	% DP máximo dos poços triplicados (para NC, PC, cada diluição do produto químico em estudo e o controlo do solvente (C0) do padrão de referência)	< 15 %
2	% DP máximo dos poços triplicados (para o controlo do veículo (VC) e para a concentração máxima do padrão de referência (C8))	< 30 %
3	Fuga máxima de LDH, como medida de citotoxicidade.	< 120 %
B - numa única placa de microtitulação		
4	Relação entre o controlo de solvente do padrão de referência mais elevadas e o controlo de solvente do produto químico de ensaio (SC; placas 2 a x)	0,70 a 1,30
5	Relação entre as concentrações aprox. de IC ₅₀ e do padrão de referência na placa 1 e as concentrações aprox. de IC ₅₀ e do padrão de referência nas placas 2 a x (C4)	0,70 a 1,30
6	Relação entre as concentrações mais elevadas do padrão de referência na placa 1 e as concentrações mais elevadas do padrão de referência nas placas 2 a x (C8)	0,50 a 2,0
7	Fator Z de cada placa	> 0,6
C - numa única série de análises (todas as placas de uma série)		
8	Curva sigmoidal dos padrões de referência	Sim (tamoxifeno)
9	Gama IC ₅₀ do padrão de referência (tamoxifeno)	1*10 ⁻⁸ - 1*10 ⁻⁷ M
10	Fator de indução mínimo do controlo de solvente do padrão de referência em relação à concentração mais elevada de tamoxifeno.	2,5
11	(%) PC indução relativa.	< 70 %
12	(%) NC indução relativa	> 85 %

Aprox.: aproximativo; PC: controlo positivo; NC: controlo negativo; VC: controlo do veículo (controlo do solvente sem concentração fixa do padrão de referência agonista); SC: controlo de solvente do produto químico em estudo; C0: controlo de solvente do padrão de referência; DP: desvio padrão; DHL: desidrogenase láctica

Controlo do solvente/veículo, padrões de referência, controlos positivos, controlos negativos

23. Tanto na série de ensaios prévios como na série de ensaios completas deve utilizar-se os mesmos controlos do solvente/veículo, padrões de referência, controlos positivos e controlos negativos. Além disso, a concentração dos padrões de referência, dos controlos positivos e dos controlos negativos deve ser a mesma.

Controlo do solvente

24. O solvente utilizado para dissolver os produtos químicos em estudo deve ser ensaiado como solvente de controlo. O dimetilsulfóxido (DMSO 1 % (v/v); N.º CAS 67-68-5) foi utilizado como veículo durante a validação do bioensaio ER α CALUX. Se for utilizado um solvente que não seja o DMSO, devem ser ensaiados no mesmo veículo todos os padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo. Note-se que o controlo do solvente para estudos antagonistas contém uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17 β -estradiol (aproximadamente a concentração EC₅₀). Para ensaiar o solvente utilizado nos estudos antagonísticos, deve ser preparado e ensaiado um controlo do veículo.

Controlo do veículo (antagonismo)

25. Para o ensaio do antagonismo, completa-se o meio com uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17 β -estradiol (aproximadamente a concentração EC₅₀). Para ensaiar o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo, deve preparar-se um meio de ensaio sem uma concentração fixa do padrão de referência agonista (17 β -estradiol). Esta amostra de controlo é indicada como o controlo do veículo. O dimetilsulfóxido [DMSO 1 % (v/v); n.º CAS 67-68-5] foi utilizado como veículo durante a validação do bioensaio ER α CALUX. Se for utilizado um solvente que não seja o DMSO, devem ser ensaiados no mesmo veículo todos os padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo.

Padrões de referência

26. O padrão de referência agonístico é o 17 β -estradiol (quadro 1). Os padrões de referência incluem uma série de diluições de oito concentrações de 17 β -estradiol ($1 \cdot 10^{-13}$, $3 \cdot 10^{-13}$, $1 \cdot 10^{-12}$, $3 \cdot 10^{-12}$, $6 \cdot 10^{-12}$, $1 \cdot 10^{-11}$, $3 \cdot 10^{-11}$, $1 \cdot 10^{-10}$ M).
27. O padrão de referência antagonístico é o tamoxifeno (quadro 2). Os padrões de referência incluem uma série de diluições de oito concentrações de tamoxifeno ($3 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $3 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $3 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ M). Cada uma das concentrações do padrão de referência antagonístico é coincubada com uma concentração fixa do padrão de referência agonístico 17 β -estradiol ($3 \cdot 10^{-12}$ M).

Controlo positivo

28. No caso de estudos agonísticos, o controlo positivo é a 17 α -metiltestosterona (quadro 1).
29. O controlo positivo para os estudos antagonísticos é o 4-hidroxitamoxifeno (quadro 2). O controlo positivo antagonístico é coincubado com uma concentração fixa do padrão de referência agonístico, 17 β -estradiol ($3 \cdot 10^{-12}$ M).

Controlo negativo

30. O controlo negativo para os estudos agonísticos é a corticosterona (quadro 1).
31. O controlo negativo para os estudos antagonísticos é o resveratrol (quadro 2). O controlo negativo antagonístico é coincubado com uma concentração fixa do padrão de referência agonístico, 17 β -estradiol ($3 \cdot 10^{-12}$ M).

Demonstração da competência técnica do laboratório (ver pontos 14 e os quadros 3 e 4 da secção «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA» do presente método)

Veículo

32. O solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo deve solubilizá-lo completamente e ser miscível com o meio celular. O DMSO, a água e o etanol (pureza 95 % a 100 %) são solventes adequados. Caso seja utilizado DMSO como solvente, a sua concentração máxima durante a incubação não deve exceder 1 % (v/v). Antes da utilização, o solvente deve ser ensaiado para verificar a ausência de citotoxicidade e de interferência com o desempenho do ensaio.

Preparação de padrões de referência, dos controlos positivos, dos controlos negativos e dos produtos químicos em estudo

33. Os padrões de referência, os controlos positivos, os controlos negativos e o produto químico em estudo são dissolvidos em DMSO a 100 %, ou num solvente adequado. Devem em seguida ser preparadas diluições adequadas (em série) no mesmo solvente. Antes da dissolução, todas as substâncias devem poder estabilizar à temperatura ambiente. As soluções recentemente preparadas dos padrões de referência, controlos positivos, controlos negativos e produtos químicos em estudo não devem apresentar precipitados nem turbidez perceptíveis. O padrão de referência e os controlos podem ser preparados a granel. As soluções de produtos químicos em estudo devem ser preparadas antes de cada ensaio. As diluições finais dos padrões de referência, dos controlos positivos, dos controlos negativos e do produto químico em estudo devem ser preparadas para cada experiência e utilizadas nas 24 horas seguintes à preparação.

Solubilidade, citotoxicidade e determinação da gama.

34. Durante a série de ensaios de avaliação prévia, é determinada a solubilidade do produto químico em estudo no solvente escolhido. Prepara-se uma concentração máxima de 0,1 M. No caso de esta concentração mostrar problemas de solubilidade, devem preparar-se soluções de concentração mais baixa até os produtos químicos serem completamente solubilizados. Durante a série de ensaios de avaliação prévia, são ensaiadas diluições em série de 1:10 do produto químico em estudo. A concentração máxima de ensaio agonistas ou antagonistas é de 1 mM. Após a série de ensaios de avaliação prévia, é derivada uma gama de concentração pomenorizada para produtos químicos em estudo que deve ser ensaiada durante as séries de ensaios completos. As diluições utilizadas para os ensaios completos devem ser 1×, 3×, 10×, 30×, 100×, 300×, 1000× e 3000×.
35. O ensaio de citotoxicidade está incluído no protocolo de ensaio agonista e antagonista (11). O ensaio de citotoxicidade é integrado tanto na série de ensaios de avaliação prévia como na série de ensaios completos. O método utilizado para avaliar a citotoxicidade durante a validação do bioensaio ERα CALUX foi o ensaio de fugas da desidrogenase láctica (LDH) em combinação com a inspeção visual qualitativa das células (ver apêndice 4.1) após a exposição aos produtos químicos em estudo. No entanto, podem utilizar-se outros métodos quantitativos para a determinação da citotoxicidade (por exemplo, ensaio colorimétrico à base de tetrazólio – MTT – ou bioensaio de citotoxicidade CALUX). Em geral, as concentrações do produto químico em estudo que apresentem uma redução da viabilidade celular superior a 20 % são consideradas citotóxicas e não podem, portanto, ser utilizadas na avaliação dos dados. No que respeita ao ensaio de fuga de LDH, a concentração do produto químico em estudo é considerada citotóxica se a percentagem de LDH for superior a 120 %.

Exposição ao produto químico em estudo e a organização da placa do ensaio

36. Após a tripsinização de um balão confluyente de células de cultura, as células voltam a ser suspensas em 1×10^5 células/ml num meio de ensaio isento de estrogénio. Colocam-se 100 µl de células ressuspensas nos poços interiores de uma placa de microtitulação com 96 poços. Os poços exteriores são preenchidos com 200 µl de solução salina tamponada de fosfato (PBS) (ver figuras 1 e 2). As células colocadas nas placas são pré-incubadas durante 24 horas numa incubadora de CO₂ (5 % de CO₂, 37 °C, 100 % de humidade).
37. Após a pré-incubação, as placas são inspecionadas para verificação da citotoxicidade visual (ver apêndice 4.1), da contaminação e da confluência. Para o ensaio, apenas são utilizadas placas que não apresentem citotoxicidade ou contaminação e tenham uma confluência mínima de 85 %. O meio dos poços interiores é cuidadosamente removido e substituído por 200 µl de meio de ensaio sem estrogénio com as diluições adequadas dos padrões de referência,

produtos químicos em estudo, controlos positivos, controlos negativos e controlos de solvente (quadro 5: estudos de agonistas; quadro 6: estudos de antagonista). Todos os padrões de referência, produtos químicos em estudo, controlos positivos, controlos negativos e controlos dos solventes são ensaiados em triplicado. Na figura 1, é apresentada a configuração das placas para os ensaios de agonistas. Na figura 2, é apresentada a configuração da placa para os ensaios de antagonistas. A configuração da placa para os ensaios de avaliação prévia e para os ensaios completos é idêntica. No caso dos ensaios antagonísticos, todos os poços interiores, exceto os poços do controlo do veículo (VC), contém igualmente uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17β -estradiol (3×10^{-12} M). Note-se que os padrões de referência C8 e C4 devem ser adicionados a todas as placas de TC.

38. Após a exposição das células a todos os produtos químicos, as placas de microtitulação de 96 poços devem ser incubadas por mais 24 horas numa incubadora de CO_2 (5 % CO_2 , 37 °C, 100 % de humidade).

Figura 1

Configuração das placas de microtitulação de 96 poços para avaliação prévia e avaliação do efeito agonístico

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Placas subsequentes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
H												

C0 = Solvente padrão de referência.

C(1-8) = Série de diluições (1-8, da concentração mais baixa para a mais alta) do padrão de referência.

PC = Controlo positivo.

NC = Controlo negativo.

TCx-(1-8) = Diluições (1-8, da concentração mais baixa para a mais alta) do produto químico em estudo para a série de ensaios de avaliação prévia e para avaliação do efeito agonístico do produto químico x.

SC = Controlo do solvente do produto químico em estudo (idealmente, o mesmo solvente de C0, mas eventualmente de outro lote).

Células cinzentas: = Poços exteriores, preenchidos com 200 µl de PBS.

Figura 2

Configuração das placas de microtitulação de 96 poços para avaliação antagonística prévia e avaliação do efeito antagonístico

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	1-7	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Placas subsequentes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
E		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
F		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
G		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
H												

C0 = Solvente padrão de referência.

C(1-8) = Série de diluições (1-8, da concentração mais baixa para a mais alta) do padrão de referência.

NC = Controlo negativo.

PC = Controlo positivo.

TCx-(1-8) = Diluições (1-8, da concentração mais baixa para a mais alta) do produto químico em estudo para a série de ensaios de avaliação prévia e para avaliação do efeito antagonístico do produto químico x.

SC = Controlo do solvente do produto químico em estudo (idealmente, o mesmo solvente de C0, mas eventualmente de outro lote).

VC = Controlo do veículo (controlo do solvente sem concentração fixa do padrão de referência agonista 17 β -estradiol).

Células cinzentas: = Poços exteriores, preenchidos com 200 μ l de PBS.

Nota: todos os poços interiores, exceto os poços do controlo do veículo (VC), contêm igualmente uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17 β -estradiol (3,0*10⁻¹² M)

Medição da luminescência

39. A medição da luminescência é descrita em pormenor no protocolo de ensaio relativo ao agonista e ao antagonista (10). O meio dos poços deve ser removido e as células devem ser lisadas após 24 horas de incubação, de modo a abrirem a membrana celular e permitirem a medição da atividade da luciferase.
40. Para medir a luminescência, este procedimento exige um luminómetro equipado com dois injetores. A reação da luciferase é desencadeada por injeção do substrato luciferino. A reação é interrompida por adição de 0,2 M NaOH, por forma a impedir a transferência de luminescência de um poço para outro.
41. A luz emitida por cada poço é expressa em unidades de luz relativa (RLU) por poço.

Série de ensaios de avaliação prévia

42. Os resultados das análises prévias são utilizados para determinar um intervalo de concentração mais preciso de produtos químicos em estudo, com vista à realização dos ensaios completos. A avaliação dos resultados das análises prévias e a determinação da gama de concentrações mais precisa de produtos químicos em estudo para ensaios completos é descrita de forma aprofundada no protocolo de ensaio de agonistas e antagonistas (10). Apresenta-se aqui um breve resumo dos procedimentos de determinação da gama de concentrações dos produtos químicos em estudo para os ensaios agonista e antagonista. Ver os quadros 5 e 6 para diretrizes para a conceção da diluição em série.

Seleção das concentrações para avaliação de efeitos agonísticos

43. Durante a série de ensaios de avaliação prévia, os produtos químicos em estudo devem ser ensaiados com a série de diluições indicada nos quadros 5 (agonismo) e 6 (antagonismo). Todas as concentrações devem ser ensaiadas em triplicado, de acordo com a configuração da placa indicada nas figuras 1 (agonismo) ou 2 (antagonismo).
44. Apenas os resultados de análises que satisfaçam os critérios de aceitação (quadro 3) são considerados válidos e podem ser utilizados para avaliar a resposta dos produtos químicos em estudo. Se uma ou mais placas de microtitulação de uma série de análises não cumprirem os critérios de aceitação, as placas de microtitulação correspondentes devem ser reanalisadas. Caso a primeira placa com a série completa de diluições do padrão de referência não cumpra os critérios de aceitação, a série completa de ensaios (6 placas) tem de ser repetida.
45. As gamas de concentração inicial dos produtos químicos em estudo devem ser ajustadas e a série de ensaios de avaliação prévia repetida no caso de:
 - se observar citotoxicidade. O procedimento de avaliação prévia deve ser repetido com concentrações não citotóxicas mais baixas do produto químico em estudo;
 - a avaliação prévia do produto químico em estudo não produzir uma curva dose-resposta completa, porque as concentrações ensaiadas geram indução máxima. Repete-se a série de ensaios de avaliação prévia com concentrações menores do produto químico em estudo.
46. Quando se observa uma resposta válida relacionada com a dose, deve selecionar-se a menor concentração à qual é observada a indução máxima sem revelar citotoxicidade. A concentração mais elevada do produto químico em estudo nas séries de ensaios completos deve ser 3 vezes superior a esta concentração selecionada.
47. Deve preparar-se uma série completa de diluições mais precisas do produto químico em estudo com as etapas de diluição indicadas no quadro 5, começando pela concentração mais alta determinada *supra*.
48. Um produto químico em estudo que não provoque qualquer efeito antagonista deve ser ensaiado nas séries de ensaio completas, começando com a concentração não citotóxica mais alta identificada na série de ensaios de avaliação prévia.

Seleção das concentrações para avaliação dos efeitos antagónicos

49. Apenas os resultados de análises que satisfaçam os critérios de aceitação (quadro 4) são considerados válidos e podem ser utilizados para avaliar a resposta dos produtos químicos em estudo. Se uma ou mais placas de microtitulação de uma série de análises não cumprirem os critérios de aceitação, devem ser reanalisadas. Caso a primeira placa com a série completa de diluições do padrão de referência não cumpra os critérios de aceitação, a série completa de ensaios (6 placas) tem de ser repetida.

50. As gamas de concentração inicial dos produtos químicos em estudo devem ser ajustadas e a série de ensaios de avaliação prévia repetida no caso de:
 - se observar citotoxicidade. O procedimento de avaliação prévia deve ser repetido com concentrações não citotóxicas mais baixas do produto químico em estudo;

 - a avaliação prévia do produto químico em estudo não produzir uma curva dose-resposta completa, porque as concentrações ensaiadas geram inibição máxima. Deve repetir-se a série de ensaios de avaliação prévia com concentrações menores do produto químico em estudo.

51. Quando se observa uma resposta válida relacionada com a dose, deve selecionar-se a menor concentração à qual é observada a inibição máxima sem revelar citotoxicidade. A concentração mais elevada do produto químico em estudo nas séries de ensaios completos deve ser 3 vezes superior a esta concentração selecionada.

52. Deve preparar-se uma série completa de diluições mais precisas do produto químico em estudo com as etapas de diluição indicadas no quadro 6, começando pela concentração mais alta determinada *supra*.

53. Um produto químico em estudo que não provoque qualquer efeito antagonista deve ser ensaiado nas séries de ensaios completos, começando com a concentração não citotóxica mais alta ensaiada na série de ensaios de avaliação prévia.

Séries de ensaios completos

54. Após a seleção das gamas de concentração aperfeiçoadas, os produtos químicos em estudo devem ser submetidos a um ensaio completo, utilizando a série de diluições indicada no quadro 5 (agonismo) e 6 (antagonismo). Todas as concentrações devem ser ensaiadas em triplicado, de acordo com a configuração da placa indicada nas figuras 1 (agonismo) ou 2 (antagonismo).

55. Apenas os resultados de análises que satisfaçam os critérios de aceitação (quadros 3 e 4) são considerados válidos e podem ser utilizados para avaliar a resposta dos produtos químicos em estudo. Se uma ou mais placas de microtitulação de uma série de análises não cumprirem os critérios de aceitação, devem ser reanalisadas. Caso a primeira placa contendo a série completa de diluições do padrão de referência não cumpra os critérios de aceitação, a série completa de ensaios (6 placas) tem de ser repetida.

Quadro 5

Concentração e diluições dos padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo utilizados nos ensaios agonistas

17β-estradiol de referência		TCx - série de ensaios de avaliação prévia		TCx - série de ensaios completos		Controlos	
conc. (M)		diluição		diluição		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3*10 ⁻⁶
C1	1*10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1*10 ⁻⁸
C2	3*10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1*10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3*10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6*10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1*10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3*10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1*10 ⁻¹⁰						

TCx - Produto químico em estudo x
 PC - Controlo positivo (17α-metiltestosterona)
 NC - Controlo negativo (corticosterona)
 C0 - Controlo do solvente padrão de referência
 SC - Controlo do solvente do produto químico em estudo

Quadro 6

Concentração e diluições dos padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo utilizados nos ensaios antagonistas

Tamoxifeno de referência		TCx - série de ensaios de avaliação prévia		TCx - série de ensaios completos		Controlos	
conc. (M)		diluição		diluição		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	1*10 ⁻⁹
C1	3*10 ⁻⁹	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1*10 ⁻⁵
C2	1*10 ⁻⁸	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3*10 ⁻⁸	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1*10 ⁻⁷	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	3*10 ⁻⁷	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	Agonista complementado	
C6	1*10 ⁻⁶	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	conc. (M)	
C7	3*10 ⁻⁶	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	3*10 ⁻¹²
C8	1*10 ⁻⁵						

TCx - Produto químico em estudo x

PC - Controlo positivo (4-hidroxitamoxafeno)

NC - Controlo negativo (resveratrol)

C0 - Controlo do solvente padrão de referência

SC - Controlo do solvente do produto químico em estudo

VC - Controlo do veículo (não contém uma concentração fixa do padrão de referência agonístico, 17β-estradiol (3*10⁻¹² M).

Recolha e análise de dados

56. Após a série de ensaios de avaliação prévia e a série de ensaios completos, devem ser determinados os valores EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} e de indução máxima ($TCx_{máx}$) de um produto químico em estudo para o ensaio agonístico. Para este último, devem ser calculados os valores de IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50} e de indução mínima ($TCx_{mín}$). Nas figuras 3 (agonismo) e 4 (antagonismo), apresenta-se uma representação gráfica destes parâmetros. Os parâmetros exigidos são calculados com base na indução relativa de cada produto químico em estudo [relativa à indução máxima do padrão de referência (= 100 %)]. Deve utilizar-se a regressão não linear (declive variável, 4 parâmetros) para a avaliação dos dados, de acordo com a seguinte equação:

$$Y = Base + \frac{(Topo - Base)}{\{1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Declive)}\}}$$

em que:

X = Log de dose ou concentração

Y = Resposta [(%) indução relativa]

Topo = (%) indução máxima

Base = (%) indução mínima

$\text{Log}(EC_{50})$ = Log da concentração à qual se observam 50 % da resposta máxima

Declive = Declive da curva de Hill

57. Os dados brutos do luminómetro, expressos em unidades de luz relativa (RLU), devem ser transferidos para a folha de cálculo da análise de dados para a série de ensaios de avaliação prévia e a série de ensaios completos. Os dados em bruto devem satisfazer os critérios de aceitação indicados nos quadros 3A e 3B (agonismo) ou 4A e 4B (antagonismo). Caso os dados em bruto satisfaçam os critérios de aceitação, efetuam-se as seguintes etapas de cálculo para determinar os parâmetros exigidos:

Agonismo

- Subtrair a RLU média do controlo do solvente do padrão referência de cada um dos dados brutos de análise dos padrões de referência.
- Subtrair a RLU média para o controlo do solvente do produto químico em estudo de cada um dos dados de análise brutos dos produtos químicos em estudo.

- Calcular a indução relativa de cada concentração do padrão de referência. Fixar a indução da mais elevada concentração do padrão de referência em 100 %.

- Calcular a indução relativa de cada concentração do produto químico em estudo em relação à concentração mais elevada do padrão de referência e estabelecê-la como 100 %.

- Avaliar os resultados da análise após a regressão não linear (inclinação variável, 4 parâmetros).

- Determinar os valores EC_{50} e EC_{10} do padrão de referência.

- Determinar os valores EC_{50} e EC_{10} dos produtos químicos em estudo.

- Determinar a indução relativa máxima do produto químico em estudo ($TC_{máx}$).

- Determinar os valores PC_{10} e PC_{50} dos produtos químicos em estudo.

No caso dos produtos químicos em estudo, pode nem ser sempre obtida uma curva dose-resposta completa devido, por exemplo, a problemas de citotoxicidade ou de solubilidade. Assim, não podem ser determinados os valores EC_{50} , EC_{10} e PC_{50} . Nesse caso, apenas podem ser determinados o PC_{10} e $TC_{máx}$.

Antagonismo

- Subtrair a RLU média da concentração mais elevada do padrão de referência de cada um dos dados brutos de análise dos padrões de referência.

- Subtrair a RLU média da concentração mais elevada do padrão de referência de cada um dos dados brutos de análise dos produtos químicos em estudo.

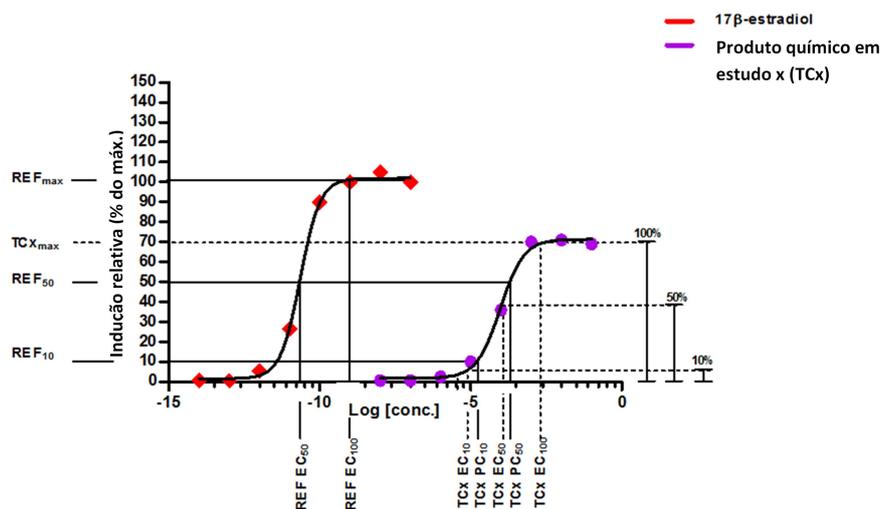
- Calcular a indução relativa de cada concentração do padrão de referência. Fixar a indução da mais baixa concentração do padrão de referência em 100 %.

- Calcular a indução relativa de cada concentração do produto químico em estudo em relação à concentração mais baixa do padrão de referência e estabelecê-la como 100 %.

- Avaliar os resultados da análise após a regressão não linear (inclinação variável, 4 parâmetros).
- Determinar os valores IC_{50} e IC_{20} do padrão de referência.
- Determinar os valores IC_{50} e IC_{20} dos produtos químicos em estudo.
- Determinar a indução relativa mínima do produto químico em estudo ($TC_{mín}$).
- Determinar os valores PC_{80} e PC_{50} dos produtos químicos em estudo.

Figura 3

Panorâmica dos parâmetros determinados no ensaio de agonistas



EC_{10} = Concentração de uma substância em que se observam 10 % da sua resposta máxima.

EC_{50} = Concentração de uma substância em que se observam 50 % da sua resposta máxima.

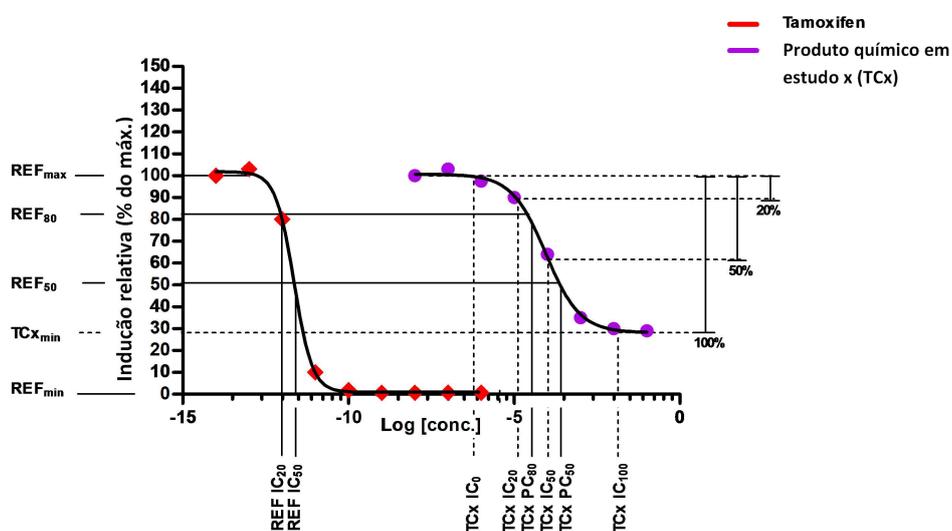
PC_{10} = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual a EC_{10} do padrão de referência.

PC_{50} = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à EC_{50} do padrão de referência.

$TCx_{máx}$ = Indução máxima relativa do produto químico em estudo.

Figura 4

Panorâmica dos parâmetros determinados no ensaio de antagonistas



IC_{20} = Concentração de uma substância em que se observa 80 % da sua resposta máxima (20 % de inibição).

IC_{50} = Concentração de uma substância em que se observa 50 % da sua resposta máxima (50 % de inibição).

PC_{80} = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à IC_{20} do padrão de referência.

PC_{50} = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à IC_{50} do padrão de referência.

TCx_{min} = Indução relativa mínima do produto químico em estudo.

No caso dos produtos químicos em estudo, pode nem ser sempre obtida uma curva dose-resposta completa devido, por exemplo, a problemas de citotoxicidade ou de solubilidade. Assim, não é possível determinar o IC_{50} , o IC_{20} e o PC_{50} . Nesse caso, só o PC_{20} e a TC_{min} podem ser determinados.

58. Os resultados devem basear-se em duas (ou três) séries de ensaios independentes. Se duas séries derem resultados comparáveis e, por conseguinte, reprodutíveis, não é necessário realizar uma terceira série de ensaios. Para serem aceitáveis, os resultados devem:

— satisfazer os critérios de aceitabilidade (ver critérios de aceitabilidade, pontos 14-22),

— ser reprodutíveis.

Critérios de interpretação dos dados

59. Para a interpretação dos dados e a decisão sobre se um produto químico é considerado positivo ou negativo, devem ser utilizados os seguintes critérios:

Agonismo

Para cada série completa de ensaios, considera-se **positivo** o produto químico em estudo nos seguintes casos:

1. A $TC_{máx}$ é igual ou superior a 10 % da resposta máxima do padrão de referência (REF_{10}).
2. Pelo menos, duas concentrações consecutivas do produto químico em estudo são iguais ou superiores ao REF_{10} .

Para cada série de ensaios completos, um produto químico em estudo é considerado **negativo** no caso de:

1. A $TC_{máx}$ não exceder 10 % da resposta máxima do padrão de referência (REF_{10}).
2. Menos de duas concentrações do produto químico em estudo serem iguais ou superiores à REF_{10} .

Antagonismo

Para cada série completa de ensaios, considera-se **positivo** o produto químico em estudo nos seguintes casos:

1. A $TC_{mín}$ é igual ou superior a 80 % da resposta máxima do padrão de referência ($REF_{80} = 20\%$ de inibição).
2. Pelo menos, duas concentrações consecutivas do produto químico em estudo são iguais ou superiores à REF_{10} .

Para cada série de ensaios completos, um produto químico em estudo é considerado **negativo** no caso de:

1. A $TC_{mín}$ exceder 80 % da resposta máxima do padrão de referência (inibição $RF_{80} = 20\%$ de inibição).
2. Menos de duas concentrações do produto químico em estudo são inferiores ou iguais à REF_{80} .

60. Para caracterizar a potência da resposta positiva de um produto químico em estudo, a magnitude do efeito (agonismo: $TC_{máx}$; antagonismo: $TC_{mín}$) e a concentração em que o efeito ocorre (agonismo: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonismo: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}) devem ser comunicadas.

RELATÓRIO DO ENSAIO

61. Ver ponto 20 dos «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA»

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
- (3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
- (4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*17(6):646-57.
- (5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavallès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.

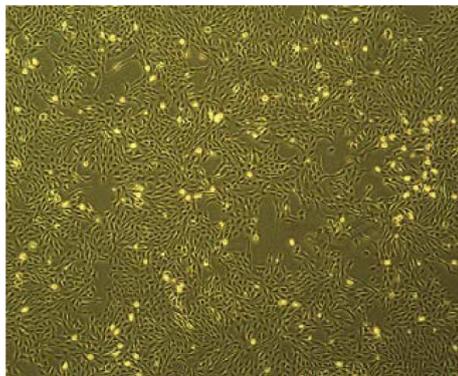
- (8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
- (9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
- (10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67-73
- (11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

Apêndice 4.1

INSPEÇÃO VISUAL DA VIABILIDADE CELULAR

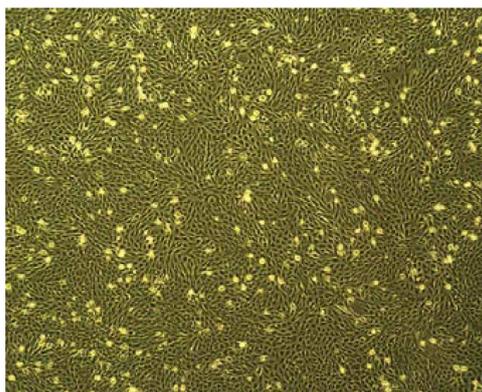


Confluência < 5 %. As células acabaram de ser semeadas. Viabilidade celular: 100 %. Classificação: «sem citotoxicidade»



Confluência > 85 %. Nesta fase, as células são expostas aos produtos químicos em estudo. Viabilidade celular > 95 %.

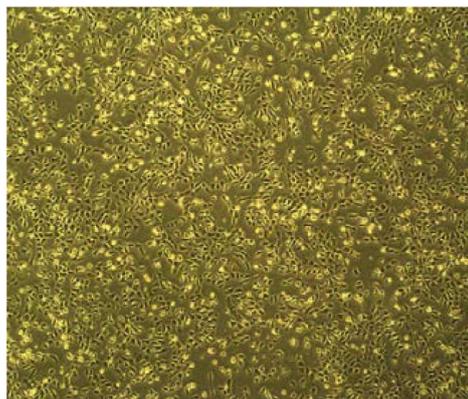
Classificação: «sem citotoxicidade»



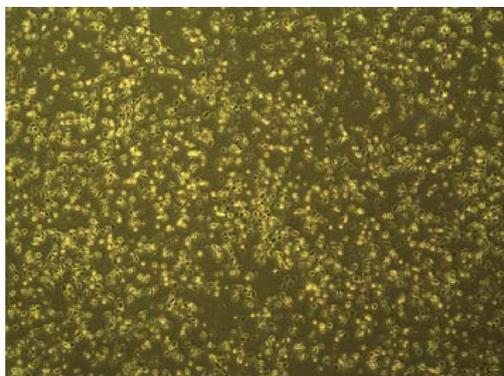
Confluência > 95 %. A cultura de células é muito densa e começam a crescer demasiado.

Viabilidade celular > 95 %.

Classificação: «sem citotoxicidade»



Viabilidade celular < 25 %. As células separam-se; o contacto entre as células diminui. As células são arredondadas. Classificação: «citotoxicidade»



Viabilidade celular < 5 %. As células estão completamente separadas e o contacto entre elas é interrompido. As células são arredondadas. Classificação: «citotoxicidade»

B.67 ENSAIO DE MUTAÇÃO GENÉTICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS IN VITRO COM O GENE DA TIMIDINA-CINASE

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 490 (2016) da OCDE. Os métodos de ensaio são analisados e revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas e do bem-estar dos animais. O ensaio do linfoma do rato (MLA) e o ensaio TK6 com o locus da timidina-cinase (TK) estavam originalmente incluídos no método de ensaio B.17. Posteriormente, o grupo de trabalho de peritos do AML do International Workshop for Genotoxicity Testing (IWGT) desenvolveu recomendações harmonizadas a nível internacional de critérios de aceitação e interpretação dos dados para o MLA (1)(2)(3)(4)(5), tendo estas recomendações sido incorporadas no novo método de ensaio B.67. O presente método de ensaio foi concebido para o ensaio MLA e, dado que utiliza também o locus TK, para o ensaio TK6. Embora o MLA tenha sido amplamente utilizado para fins normativos, o TK6 tem sido utilizado com muito menos frequência. Note-se que, apesar da semelhança entre os parâmetros, as duas linhas celulares não são permutáveis e os programas de regulamentação podem manifestar preferência no respeitante a uma determinada utilização regulamentar. Por exemplo, a validação do MLA demonstrou que o método é adequado para detetar não só as mutações genéticas, mas também a capacidade de um produto químico em estudo para induzir danos cromossómicos estruturais. O presente método faz parte de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente introduzidas nas orientações da OCDE neste domínio (6).
2. O objetivo dos ensaios de mutação genética de células de mamíferos *in vitro* é detetar mutações genéticas induzidas por produtos químicos. As linhas celulares utilizadas nestes ensaios indicam mutações em genes repórteres, nomeadamente no gene da timidina-cinase endógeno (TK para células humanas e *Tk* para células de roedores, coletivamente designadas TK). O presente método de ensaio destina-se a ser utilizado com duas linhas celulares: a linha celular L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C do linfoma do rato (geralmente designada L5178Y) e a linha celular linfoblastoide humana TK6 (geralmente designada TK6). Embora as duas linhas variem devido à sua origem, crescimento celular, estatuto p53, etc., os ensaios da mutação do gene *Tk* podem ser realizados de forma semelhante em ambos os tipos de células, conforme descrito no presente método de ensaio.
3. A natureza autossómica e heterozigótica do gene da timidina-cinase permite detetar colónias viáveis cujas células são deficientes em enzima timidina-cinase após a mutação de TK^{+/-} para TK^{-/-}. Essa deficiência pode resultar de eventos genéticos que afetam o gene *Tk*, incluindo mutações genéticas (mutações pontuais, mutações que deslocam o quadro de leitura, supressão de pequenas sequências, etc.) e eventos cromossómicos (supressão de grandes sequências e rearranjos cromossómicos, recombinação mitótica). Estes últimos são expressos em perdas de heterozigosidade, que é uma mudança genética comum de genes supressores tumorais na tumorigénese humana. Teoricamente, a perda de todo o cromossoma que comporta o gene *Tk* na sequência de perturbações do fuso mitótico e/ou não disjunção mitótica pode ser detetada no MLA. Com efeito, uma combinação de análises citogenéticas e moleculares mostra claramente que alguns TK mutantes do MLA resultam da ausência de disjunção. No entanto, a análise das provas mostra que os ensaios de mutação do gene *Tk* não permitem detetar de forma fiável a aneugénese aplicando critérios normais de citotoxicidade (descritos no presente método de ensaio), pelo que não é adequado utilizar estes ensaios para detetar a aneugénese (7)(8)(9).
4. A mutação do gene *Tk* gera duas classes fenotípicas distintas de mutantes TK: os mutantes de crescimento normal, que crescem ao mesmo ritmo que as células heterozigóticas TK, e os mutantes de crescimento lento, que crescem com períodos de duplicação longos. Os mutantes de crescimento normal e de crescimento lento são reconhecidos como mutantes de colónia grande e mutantes de colónia pequena no MLA e como mutantes de colónia rápida e mutantes de colónia tardia no TK6. Foi explorada aprofundadamente a natureza molecular e citogenética dos mutantes do MLA de colónia grande e colónia pequena (8) (10) (11) (12) (13). A natureza molecular e citogenética dos mutantes TK6 de colónia rápida e de colónia tardia foram também objeto de estudo exaustivo (14) (15) (16) (17). Os mutantes de crescimento lento de ambos os tipos de células sofreram danos genéticos que envolvem genes putativos reguladores do crescimento perto do locus do TK e que resultam em tempos de duplicação prolongados e na formação de colónias tardias ou pequenas (18). A indução de mutantes de crescimento lento foi associada à ação de produtos químicos que induzem grandes variações estruturais ao nível do cromossoma. As células cujo dano não implica o(s) gene(s) putativo(s) regulador(es) do crescimento perto do locus do TK crescem a ritmos similares aos das células parentais e tornam-se mutantes de crescimento normal. A indução de mutantes de crescimento normal está associada a produtos químicos que funcionam principalmente como mutagénicos pontuais. Por conseguinte, é essencial contar tanto os mutantes de crescimento lento como os mutantes de crescimento normal para recuperar todos os mutantes e fornecer informações sobre o(s) tipo(s) de danos (mutagénicos/clastogénicos) induzidos pelo produto químico em estudo (10) (12) (18) (19).

5. O método de ensaio está estruturado de modo a fornecer informações gerais aplicáveis tanto ao MLA como ao TK6, e orientações específicas para os ensaios individuais.
6. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

7. Os ensaios realizados *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de ativação metabólica. Os sistemas exógenos de ativação metabólica não reproduzem totalmente as condições *in vivo*.
8. Deve ter-se o cuidado de evitar condições suscetíveis de conduzir a resultados falsos positivos (ou seja, possível interação com o sistema de ensaio) não causados pela interação direta entre o produto químico em estudo e o material genético da célula; essas condições incluem variações do pH ou da pressão osmótica, a interação com os componentes do meio (20) (21) ou níveis excessivos de citotoxicidade (22)(23)(24). No MLA e no TK6, é considerada excessiva uma citotoxicidade que exceda os níveis de citotoxicidade máxima recomendados, estabelecidos no ponto 28. Além disso, é de notar que os produtos químicos em estudo análogos da timidina, ou com comportamento idêntico aos produtos análogos da timidina, podem aumentar a frequência de mutação por via do crescimento seletivo dos mutantes espontâneos durante o tratamento celular, exigindo métodos de ensaio complementares para uma avaliação adequada (25).
9. No caso dos nanomateriais fabricados, podem ser necessárias adaptações específicas ao presente método de ensaio, que não são descritas no mesmo.
10. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.
11. As células mutantes deficientes em atividade enzimática da timidina-cinase devido a uma mutação $TK^{+/-}$ para $TK^{-/-}$ são resistentes aos efeitos citostáticos do análogo de pirimidina da trifluorotimidina (TFT). As células que dispõem de timidina-cinase são sensíveis ao TFT, que causa inibição do metabolismo celular e impede a divisão da célula. Logo, as células mutantes podem proliferar na presença de TFT, o que não acontece com as células que contêm a enzima timidina-cinase.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

12. As células em suspensão são expostas ao produto químico em estudo, com e sem uma fonte exógena de ativação metabólica (ver ponto 19), por um período adequado (ver ponto 33), e, em seguida, subcultivadas para determinar a citotoxicidade e permitir a expressão fenotípica antes da seleção de mutantes. A citotoxicidade é determinada pelo crescimento relativo total (RTG, ver ponto 25), para o MLA, e pela sobrevivência relativa (RS, ver ponto 26), para o TK6. As culturas expostas são mantidas em meio de crescimento durante um período suficiente, específico de cada tipo de célula (ver ponto 37), por forma a permitir uma expressão fenotípica tão boa quanto possível das mutações induzidas. Após a expressão fenotípica, determina-se a frequência de mutação mediante a inoculação de um número conhecido de células num meio que contenha o agente seletivo, para a deteção de colónias mutantes, e num meio sem agente seletivo, para determinar as respetivas eficiências de clonagem (viabilidade). Após um período de incubação apropriado, procede-se à contagem das colónias. A frequência de mutação é calculada com base no número de colónias mutantes corrigido pela eficiência de clonagem no momento da seleção dos mutantes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Células

13. Para o MLA: Dado o MLA ter sido desenvolvido e caracterizado com a sublinha $TK^{+/-}$ -3.7.2C das células L5178Y, tem de se utilizar esta sublinha específica. A linha celular L5178Y foi derivada de um linfoma num timo de rato induzido por metilcolantreno DBA2 (26). Clive *et al.* trataram células L5178Y (designadas por Clive como $TK^{+/-}$ -3) com metanossulfonato de etilo e isolaram um clone $TK^{-/-}$ (designado $TK^{-/-}$ -3.7), usando bromodesoxiuridina como agente seletivo. A partir do clone $TK^{-/-}$, foram isolados e caracterizados para uso na AML um clone $TK^{+/-}$ espontâneo (designado $TK^{+/-}$ -3.7.2.) e um subclone (designado $TK^{+/-}$ -3.7.2C) (27). O cariótipo da linha celular

encontra-se publicado (28) (29) (30) (31). O número modal de cromossomas é 40. Existe um cromossoma metacêntrico (t12; 13) que deve ser contabilizado como cromossoma. O locus da TK do rato está localizado na extremidade distal do cromossoma 11. A linha celular L5178Y TK^{+/-}-3,7.2C tem mutações em ambos os alelos p53 e produz a proteína mutante p53 (32) (33). O estatuto p53 da linha celular TK^{+/-}-3,7.2C é provavelmente responsável pela capacidade do ensaio para detetar danos em grande escala (17).

14. Para o TK6: O TK6 é uma linha celular linfoblastoide humana. A linha celular-mãe é uma linha transformada pelo vírus de Epstein-Barr, WI-L2, originalmente derivada de um indivíduo do sexo masculino de 5 anos com esferocitose hereditária. O primeiro clone isolado, HH4, foi mutagenizado com ICR191, tendo sido gerada uma linha celular TK heterozigótica – TK6 (34). As células TK6 são quase diploides e o cariotipo representativo é 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). O locus da TK humana está situado no braço longo do cromossoma 17. O TK6 é uma linha celular competente em p53, pois possui uma sequência de p53 de tipo selvagem em ambos os alelos e exprime apenas proteínas p53 do tipo selvagem (36).
15. Tanto para o MLA como para o TK6, quando se estabelece ou reconstitui uma solução de reserva celular primária, é aconselhável que o laboratório de ensaio possa garantir a ausência de contaminação por *micoplasma*, identifique o cariótipo das células ou marque os cromossomas com o locus da TK, e verifique o tempo de duplicação da população. Deve estabelecer-se o tempo normal do ciclo celular para as células utilizadas no laboratório de ensaio, tempo esse que deve ser coerente com as características celulares publicadas (16) (19) (37). Esta solução de reserva celular primária deve ser armazenada a uma temperatura não superior a -150 °C e usada para preparar todas as soluções de reserva de células de trabalho.
16. Quer antes do estabelecimento de um grande número de soluções de reserva de trabalho criopreservadas, quer imediatamente antes da sua utilização numa experiência, a cultura pode ter de ser limpa de células mutantes pré-existentes [a menos que a frequência de mutação (MF) do controlo do solvente já se encontre dentro da margem admissível – ver o quadro 2 para o MLA]. Para tal, utiliza-se metotrexato (aminopterina) para selecionar células deficientes em TK e adicionar à cultura timidina, hipoxantina e glicina (L5178Y) ou 2'-desoxicidina (TK6), de forma a garantir o crescimento ótimo das células competentes em TK (19)(38)(39) e (40), para TK6. Em (19) (31) (37) (39) (41) podem encontrar-se orientações gerais sobre boas práticas de manutenção de culturas celulares, bem como aconselhamento específico para as células L5178Y e TK6. Relativamente aos laboratórios que necessitam de soluções de reserva celulares primárias para iniciar o MLA ou o TK6 ou para obter soluções de reserva de células principais, está disponível um repositório de células bem caracterizadas (37).

Meios e condições de cultura

17. Em ambos os ensaios, devem utilizar-se meios de cultura e condições de incubação adequados para a conservação das culturas (por exemplo, recipientes de cultura, atmosfera humidificada com 5 % de CO₂, temperatura de incubação de 37 °C). As culturas celulares devem ser sempre mantidas em condições que assegurem o seu crescimento exponencial. É particularmente importante escolher meios e condições de cultura que garantam um crescimento ótimo das células durante o período de expressão e clonagem das células mutantes e não mutantes. Para o MLA e o TK6, é também importante que as condições de cultura garantam um crescimento ótimo dos mutantes TK, tanto de grande colónia ou colónia rápida como de pequena colónia ou colónia tardia. Para mais informações sobre a cultura, incluindo a necessidade de aquecer adequadamente o soro de cavalo inativado, caso se utilize o meio RPMI durante a seleção de mutantes, consultar (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Preparação das culturas

18. As células são propagadas a partir de soluções de reserva de culturas, inoculadas num meio de cultura a uma densidade que permita que as culturas em suspensão continuem a crescer exponencialmente durante o tratamento e os períodos de expressão.

Ativação metabólica

19. Quando se utilizam as células L5178Y e TK6, deve recorrer-se a sistemas metabolizantes exógenos, dado a sua capacidade metabólica endógena ser inadequada. O sistema que se utiliza com maior frequência, recomendado por defeito – salvo justificação em contrário – é uma fração pós-mitocondrial reforçada com co-fator (S9) preparada a partir de fígados de roedores (em geral, ratas) tratados com agentes de indução enzimática, como, por exemplo, Aroclor 1254 (43) (44) (45) ou uma mistura de fenobarbital e β-naftoflavona (46) (47) (48) (49) (50) (51). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (52) e

comprovou-se ser tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (45)(46)(47)(48)(49). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama de 1 % a 2 %, que podem ser aumentadas para a 10 % (v/v) no meio de ensaio final. A escolha do tipo e da concentração de sistema exógeno de ativação metabólica ou do indutor metabólico utilizado pode ser influenciada pela classe dos produtos químicos em estudo.

Preparação do produto químico em estudo

- Os produtos químicos em estudo sólidos devem ser dissolvidos em solventes adequados e, se necessário, diluídos antes do tratamento das células (ver ponto 21). Os produtos químicos em estudo líquidos podem ser adicionados diretamente ao sistema de ensaio e/ou ser diluídos antes de serem utilizados no tratamento. Para o ensaio de produtos químicos gasosos ou voláteis, devem efetuar-se alterações adequadas aos protocolos normalizados, optando, por exemplo, pelo tratamento em recipientes de cultura fechados (53)(54)(55). A preparação do produto químico em estudo deve ser feita imediatamente antes do tratamento, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que pode ser armazenado.

CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Solventes

- O solvente deve ser escolhido de modo a otimizar a solubilidade dos produtos químicos em estudo sem afetar negativamente a realização do ensaio – por exemplo, alterando o crescimento celular, afetando a integridade do produto químico em estudo, reagindo com os recipientes de cultura ou alterando o sistema de ativação metabólica. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente (ou meio de cultura) aquoso. A água e o dimetil-sulfóxido, por exemplo, são solventes cujo desempenho é bem conhecido. No meio de tratamento final, os solventes orgânicos não devem exceder, em geral, 1 % (v/v) e os solventes aquosos (salinos ou água) não devem exceder 10 % (v/v). Se forem utilizados solventes cujo desempenho não é bem conhecido (p. ex., etanol ou acetona), devem fornecer-se dados que comprovem a respetiva compatibilidade com os produtos químicos e o sistema em estudo, bem como a inexistência de genotoxicidade à concentração utilizada. Na ausência de dados comprovativos, é importante incluir amostras de controlo não tratadas (ver apêndice 1, «Definições») para demonstrar que o solvente escolhido não tem efeitos deletérios ou mutagénicos.

MEDIÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES DE TRATAMENTO

- Ao determinar a concentração máxima a ensaiar do produto químico em estudo, devem evitar-se concentrações passíveis de gerar respostas positivas falsas, como as que produzam citotoxicidade excessiva (ver ponto 28), precipitação no meio de cultura (ver ponto 20) ou alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (ver ponto 8). Se, ao ser adicionado, o produto químico em estudo causar uma alteração pronunciada do pH do meio, este pode ser ajustado por tamponamento do meio de tratamento final, de modo a evitar falsos resultados positivos e manter condições de cultura adequadas.
- A seleção da concentração baseia-se na citotoxicidade e noutras considerações (ver pontos 27-30). Embora a avaliação da citotoxicidade num ensaio preliminar possa ser útil para definir melhor as concentrações a utilizar no ensaio principal, não é indispensável realizar esse ensaio. Mesmo no caso de se proceder a uma avaliação preliminar da citotoxicidade, continua a ser necessária a determinação da citotoxicidade em cada cultura no ensaio principal. Se for realizado um ensaio de determinação da gama de concentrações, este deve abranger uma vasta gama e pode terminar no dia 1 após o tratamento ou prolongar-se durante os dois dias de expressão, até à seleção de mutantes (caso se verifique que as concentrações utilizadas são adequadas).
- Deve determinar-se a citotoxicidade para cada cultura de ensaio e para cada cultura de controlo: os métodos para MLA (2) e TK6 (15) são definidos por práticas acordadas a nível internacional.
- Tanto para o ágar como para as variantes micropoços do MLA: deve avaliar-se a citotoxicidade utilizando o crescimento relativo total (RTG) originalmente definido por Clive e Spector em 1975 (2). Esta medida inclui a suspensão relativa do crescimento durante o tratamento das células (RSG: cultura de ensaio *versus* controlo do solvente), o tempo de expressão e a eficiência relativa de clonagem no momento em que os mutantes são selecionados (RCE: cultura de ensaio *versus* controlo do solvente) (2). Note-se que a RSG inclui todas as perdas de células que ocorram na cultura de ensaio durante o tratamento (ver fórmulas no apêndice 2).

26. Para o TK6: A citotoxicidade deve ser avaliada utilizando a taxa de sobrevivência relativa (RS), ou seja, a eficiência de clonagem das células colocadas em placas imediatamente após o tratamento, ajustada para ter em conta qualquer perda de células durante o tratamento, com base na contagem de células em comparação com o controlo negativo (taxa de sobrevivência de 100 %) (ver a fórmula no apêndice 2).
27. Devem avaliar-se pelo menos quatro concentrações de ensaio (não incluindo os controlos de solvente e positivos) que satisfaçam os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade adequada, número de células, etc.). Embora seja aconselhável a utilização de culturas em duplicado, são igualmente aceitáveis culturas únicas em todas as concentrações a ensaiar. Os resultados obtidos com culturas replicadas independentes, a uma dada concentração, devem ser comunicados separadamente, mas podem ser agrupados para a análise de dados (55). No caso dos produtos químicos que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, são normalmente adequadas concentrações espaçadas por um fator de 2 a 3. Quando se observa citotoxicidade, as concentrações escolhidas devem abranger uma gama com início na concentração que produz citotoxicidade, conforme descrito no ponto 28, e que inclua as concentrações às quais se observa pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitos produtos químicos em estudo apresentam curvas concentração-resposta com declive acentuado, pelo que, para abranger toda a gama de citotoxicidade ou para estudar em pormenor a relação dose-resposta, será necessário recorrer a concentrações menos espaçadas e a mais de quatro concentrações, em especial nos casos em que for necessário repetir o ensaio (ver ponto 70). A utilização de mais de quatro concentrações pode ser particularmente importante quando se utilizam culturas únicas.
28. Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deverá visar entre 20 % e 10 % de RTG para o MLA e entre 20 % e 10 % de RS para o TK6 (ponto 67).
29. No caso de produtos químicos pouco solúveis que não sejam citotóxicos a concentrações inferiores à concentração insolúvel mínima, a maior concentração analisada deve produzir, no final do tratamento com o produto químico em estudo, turbidez ou um precipitado visível a olho nu ou com o auxílio de um microscópio invertido. Mesmo no caso de se observar citotoxicidade acima da menor concentração insolúvel, é conveniente ensaiar uma única concentração que produza turbidez ou um precipitado visível, devido aos efeitos falsos que possam ser induzidos pelo precipitado. Dado que os ensaios MLA e TK6 utilizam culturas em suspensão, deve ter-se o cuidado de assegurar que os precipitados não interferem com a realização do ensaio. Neste contexto, pode igualmente ser útil determinar a solubilidade no meio de cultura antes do ensaio.
30. Se não se observar precipitado nem citotoxicidade condicionante, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (57)(58). Se o produto químico em estudo não tiver composição definida (caso, p. ex., de uma substância de composição desconhecida ou variável, de produtos de reação complexos ou de materiais biológicos [ou seja, substâncias químicas de composição desconhecida ou variável (UVCB)], de extratos ambientais, etc.), a concentração de topo poderá ter de ser mais elevada (p. ex., 5 mg/ml) na ausência de citotoxicidade, para aumentar a concentração de cada um dos componentes. Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (59).

Controlos

31. Para cada uma das condições experimentais, devem também realizar-se controlos negativos paralelos (ver ponto 21), em que as células são expostas apenas ao solvente e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal.
32. São necessários controlos positivos para demonstrar a capacidade do laboratório para identificar mutagénios nas condições do protocolo de ensaio, a eficácia do sistema exógeno de ativação metabólica – se pertinente – e para detetar de forma adequada mutantes TK de colónias pequenas/tardias e de colónias grandes/rápidas. O quadro 1 apresenta exemplos de controlos positivos. Se tal se justificar, podem utilizar-se outras substâncias de controlo positivo. Dado que os ensaios de toxicidade genética *in vitro* em células de mamíferos estão suficientemente normalizados no que respeita a tratamentos paralelos de curta duração (3-4 horas) com e sem ativação metabólica por período idêntico, o recurso a produtos químicos de controlo positivo pode limitar-se a um mutagénico que necessite de ativação metabólica. Neste caso, a resposta de controlo positiva única demonstrará a atividade do sistema de ativação metabólica e a capacidade de resposta do sistema de ensaio. No entanto, devem efetuar-se controlos positivos para os tratamentos de longa duração (24 horas sem S9), dado que a duração do tratamento diferirá da do ensaio com ativação metabólica. Cada amostra de controlo positiva deverá ser utilizada numa ou mais das concentrações a que se prevê um aumento detetável e reprodutível relativamente à base, a fim de demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio; a resposta não deve ser comprometida pela citotoxicidade, de modo a exceder os limites especificados no método de ensaio (ver ponto 28).

Quadro 1

Substâncias de referência recomendadas para avaliação da competência técnica de um laboratório e para a seleção dos controlos positivos

Categoria	Substância	N.º CAS
1. Mutagénios ativos sem ativação metabólica		
	Metanossulfonato de metilo	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5
2. Mutagénios que necessitam de ativação metabólica		
	Benzo[a]pireno	50-32-8
	Ciclofosfamida mono-hidratada	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetilbenzoantraceno	57-97-6
	3-Metilcolantreno	56-49-5

PROCEDIMENTO

Tratamento com o produto químico em estudo

33. As células em proliferação são expostas ao produto químico em estudo na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica. A exposição deve ter uma duração adequada (normalmente, de 3 a 4 horas). Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (59). No caso do MLA, se o tratamento de curta duração produzir resultados negativos e existirem dados que sugiram a necessidade de um tratamento mais longo [por exemplo, dispositivos análogos dos nucleósidos, produtos químicos pouco solúveis, (5) (59)], deve ponderar-se a possibilidade de prolongar o ensaio – por exemplo, 24 horas sem S9.
34. O número mínimo de células utilizado para cada cultura (controlada e tratada), em cada fase do ensaio, deve basear-se na frequência de mutação espontânea. Uma orientação genérica consiste em tratar e passar células suficientes em cada cultura experimental para manter, no mínimo, 100 mutantes espontâneos em todas as fases do ensaio (tratamento, expressão fenotípica e seleção de mutantes) (56).
35. Para o MLA, a frequência de mutação espontânea recomendada aceitável situa-se entre $35-140 \times 10^{-6}$ (versão ágar) e $50-170 \times 10^{-6}$ (versão micropoço) (ver quadro 2). Para ter pelo menos 10 e, idealmente, 100 mutantes espontâneos sobreviventes ao tratamento em cada cultura de ensaio, é necessário tratar pelo menos 6×10^6 células. O tratamento deste número de células e a manutenção de um número suficiente de células durante a fase de expressão e de clonagem para seleção de mutantes assegura um número suficiente de mutantes espontâneos (10 ou mais) em todas as fases da experiência, mesmo para as culturas tratadas em concentrações que resultam numa citotoxicidade de 90 % (medida por um RTG de 10 %) (19) (38) (39).
36. Para o TK6, a frequência de mutação espontânea é, em geral, entre 2 e 10×10^{-6} . Para ter, pelo menos, 10 mutantes espontâneos sobreviventes ao tratamento em cada cultura, é necessário tratar, pelo menos, 20×10^6 células. O tratamento deste número de células assegura um número suficiente de mutantes espontâneos (10 ou mais), mesmo nas culturas tratadas com concentrações que provoquem 90 % de citotoxicidade durante o tratamento (10 % RS). Além disso, deve cultivar-se um número suficiente de células durante o período de expressão, colocadas em placas para seleção de mutantes (60).

Período de expressão fenotípica e determinação da citotoxicidade e da frequência de mutação

37. No final do período de exposição, as células são cultivadas por um determinado período, para permitir a expressão fenotípica quase ótima das mutações recentemente induzidas, específicas de cada linha celular. Para o MLA, o período de expressão fenotípica é de 2 dias. Para o TK6, é de 3-4 dias. Se for utilizado um tratamento de 24 horas, o período de expressão tem início após o final do tratamento.
38. Durante o período de expressão fenotípica, as células são contadas diariamente. Para o MLA, as contagens de células diárias são utilizadas para calcular o crescimento diário da suspensão (SG). Após o período de expressão de 2 dias, as células são suspensas num meio com e sem agente seletivo, para a determinação do número de mutantes (placas de seleção) e da eficiência de clonagem (placas de viabilidade), respetivamente. No caso do MLA, existem dois métodos igualmente aceitáveis de clonagem para seleção de mutantes: um que utiliza ágar macio e outro que utiliza meio líquido em placas de 96 poços (19) (38) (39). A clonagem no TK6 é efetuada com um meio líquido e placas de 96 poços (16).
39. A trifluorotimidina (TFT) é o único agente seletivo recomendado para mutantes TK (61).
40. Para o MLA, as placas de ágar e as placas de micropoços são contadas após 10 a 12 dias de incubação. No que diz respeito ao TK6, as colónias em placas de micropoços são contadas após 10 a 14 dias, para a deteção de mutantes precoces. A fim de recuperar os mutantes TK6 de crescimento lento (aparecimento tardio), é necessário voltar a expor as células a um meio de crescimento e a TFT após contagem dos mutantes precoces, e incubar as placas durante mais 7-10 dias (62). Ver pontos 42 e 44 para uma reflexão sobre a contagem dos mutantes TK de crescimento lento e normal.
41. O apêndice 2 especifica os cálculos adequados para os dois ensaios, incluindo os dois métodos (ágar e micropoço) para o MLA. No respeitante ao método ágar do MLA, as colónias são contadas e o número de colónias mutantes ajustado pela eficiência de clonagem para calcular uma MF. Quanto à versão de micropoços do MLA e do TK6, a eficiência de clonagem das placas de seleção e de clonagem é determinada de acordo com a distribuição de Poisson (63). Calcula-se a MF é calculada a partir destas duas eficiências de clonagem.

Caracterização de colónias mutantes

42. No MLA, se o produto químico em estudo for positivo (ver pontos 62 e 63), deve proceder-se à caracterização das colónias por dimensão ou por crescimento em, pelo menos, uma das culturas de ensaio (geralmente a concentração positiva mais elevada aceitável) e nos controlos negativos e positivos. Se o produto químico em estudo for negativo (ver ponto 64), a caracterização das colónias mutantes deve basear-se nos controlos negativos e positivos. No método dos micropoços do MLA, as colónias de mutantes pequenas são definidas como as que cobrem menos de 25 % do diâmetro do poço e as colónias de mutantes grandes como as que cobrem mais de 25 % do diâmetro do poço. No método do ágar, é utilizado um contador de colónias automático para contar as colónias mutantes e para medição do tamanho das colónias. As abordagens relativas à medição do tamanho das colónias constam das referências bibliográficas (19) (38) (40). É necessário caracterizar as colónias nos controlos negativos e positivos para demonstrar que os estudos são realizados de modo adequado.
43. O produto químico em estudo não pode ser considerado negativo se não se detetarem adequadamente colónias de mutantes grandes e colónias de mutantes pequenas no controlo positivo. A caracterização das colónias pode ser usada para obter informações gerais sobre a capacidade do produto químico em estudo de provocar mutações pontuais e/ou eventos cromossómicos (ponto 4).
44. TK6: Os mutantes de crescimento normal e de crescimento lento são diferenciados pela diferença do tempo de incubação (ver ponto 40). Para o TK6, em geral, os mutantes precoces e tardios são contados em todas as culturas, incluindo os controlos negativos e positivos. A caracterização das colónias dos controlos negativos e positivos é necessária para demonstrar que os estudos são realizados de modo adequado. O produto químico em estudo não pode ser considerado negativo se não for adequadamente detetada no controlo positivo a presença de mutantes precoces e tardios. A caracterização das colónias pode ser usada para fornecer informações gerais sobre a capacidade do produto químico em estudo de provocar mutações pontuais e/ou eventos cromossómicos (ponto 4).

Competência técnica do laboratório

45. A fim de demonstrar que possui experiência suficiente com o ensaio antes de o realizar de forma rotineira, o laboratório deve ter realizado uma série de experiências com substâncias de referência positivas, que atuem através de diferentes mecanismos (pelo menos uma substância ativa com ativação metabólica e uma substância ativa sem ativação metabólica, selecionadas a partir das substâncias enumeradas no quadro 1), e vários controlos negativos (culturas não tratadas e vários solventes/veículos). As respostas observadas aos controlos positivos e negativos devem ser coerentes com as referências bibliográficas. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos, tal como se define nos pontos 47-50. No caso do MLA, os valores obtidos para os controlos positivos e negativos devem ser coerentes com as recomendações do IWGT (ver quadro 2).
46. Deve estudar-se uma seleção de substâncias de controlo positivo (ver quadro 1), com tratamentos curtos e longos (se forem utilizados tratamentos longos) na ausência de ativação metabólica, bem como com tratamentos curtos na presença de ativação metabólica, com vista a demonstrar competência técnica para detetar produtos químicos mutagénicos, determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica e demonstrar a adequação das condições de crescimento das células durante o tratamento, a expressão fenotípica, a seleção de mutantes e os procedimentos de contagem. A gama de concentrações das substâncias selecionadas deve ser escolhida de forma a proporcionar aumentos reprodutíveis e dependentes da concentração relativamente ao nível de base, que permitam demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio.

Dados históricos de controlo

47. O laboratório deve elaborar:

- um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos;
- um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos (amostras não tratadas, solvente).

48. Quando se obtêm os primeiros dados para uma distribuição histórica do controlo negativo, os controlos negativos paralelos devem ser coerentes com os dados de controlo negativo publicados. À medida que forem sendo adicionados mais dados experimentais à distribuição dos controlos, os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % daquela distribuição (64) (65).
49. A base de dados históricos de controlo negativo deve ser inicialmente constituída por um mínimo de 10 experiências, embora de preferência, seja constituída por, pelo menos, 20 experiências efetuadas em condições comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo [p. ex., gráficos C ou gráficos de barras (65)], para identificar a variabilidade dos seus dados de controlo positivo e negativo e demonstrar que, no seu laboratório, a metodologia está sob controlo (66). A referência bibliográfica (64) contém mais informações e recomendações sobre a forma de obter e utilizar os dados históricos.
50. Os dados de controlo negativo devem consistir em frequências de mutação em culturas únicas ou, de preferência, replicadas, conforme descrito no ponto 27. Os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % da distribuição da base de dados históricos do laboratório sobre o controlo negativo. Os dados do controlo negativo que se situem fora dos limites de controlo de 95 % podem ser aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlo se não forem valores extremos, se houver indícios de que o sistema de ensaio está sob controlo (ver ponto 49) e se não houver indícios de erros humanos ou técnicos.
51. As eventuais alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função da coerência dos dados com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. As incoerências de monta devem conduzir à constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

DADOS E RELATÓRIOS

Apresentação dos resultados

52. A apresentação de dados para o MLA e para o TK6 deve incluir, no respeitante às culturas tratadas e de controlo, os dados necessários para o cálculo da citotoxicidade (RTG ou RS, respetivamente) e das frequências de mutação, conforme a seguir se descreve.
53. No caso do MLA, devem ser fornecidos dados de cultura individuais para a RSG, o RTG, a eficiência de clonagem no momento da seleção de mutantes e o número de colónias mutantes (na versão ágar) ou o número de poços vazios (na versão micropoços). A MF deve ser expressa em número de células mutantes por milhão de células sobreviventes. Se a resposta for positiva, devem fornecer-se as MF das pequenas e grandes colónias (e/ou a percentagem da MF total) para, pelo menos, uma concentração do produto químico em estudo (geralmente a concentração positiva mais elevada) e para os controlos negativos e positivos. Em caso de resposta negativa, devem indicar-se as MF das colónias grande e pequena para o controlo negativo e o controlo positivo.
54. No que diz respeito ao TK6, devem fornecer-se dados de cultura individuais para a RS, a eficiência de clonagem no momento da seleção de mutantes e o número de poços vazios de mutantes precoces e tardios. A MF deve ser expressa em número de células mutantes por número de células sobreviventes, incluindo a MF total e a MF (e/ou a percentagem da MF total) dos mutantes precoces e tardios.

CrITÉRIOS de aceitabilidade

55. Antes da determinação dos resultados globais relativos a um dado produto químico em estudo, devem estar cumpridos os seguintes critérios, tanto para o MLA como para o TK6:
- Foram ensaiadas duas condições experimentais (tratamento curto com e sem ativação metabólica – ver ponto 33), salvo se uma tiver dado resultados positivos.
 - Deve ser possível analisar um número adequado de células e concentrações (ver pontos 27 e 34-36).
 - Os critérios de seleção da concentração máxima são coerentes com os descritos nos pontos 28 a 30.

CrITÉRIOS de aceitabilidade dos controlos negativos e positivos

56. A análise de um volume importante de dados pelo grupo de trabalho de peritos do IWGT sobre o MLA resultou num consenso internacional quanto aos critérios de aceitabilidade específicos do MLA (1) (2) (3) (4) (5). Por conseguinte, o presente método de ensaio formula recomendações específicas para determinar a aceitabilidade dos controlos negativos e positivos e para a avaliação dos resultados das várias substâncias no MLA. Para o TK6, a base de dados é muito mais reduzida e não foi avaliada por um grupo de trabalho.
57. Em relação ao MLA, cada experiência deve ser avaliada de modo a verificar se as amostras de controlo não tratadas e com solvente cumprem os critérios de aceitação do grupo de trabalho do IWGT sobre o MLA [(4) e quadro 2 *infra*] no respeitante ao seguinte: (1) as MF (note-se que as MF aceitáveis para o IWGT diferem para as versões ágar e de micropoços do MLA), (2) a eficiência de clonagem (CE) no momento do processo da seleção de mutantes e (3) o crescimento das suspensões (SG) para o controlo do solvente (ver fórmulas no apêndice 2).

*Quadro 2***CrITÉRIOS de aceitabilidade para o MLA**

Parâmetro	Método do ágar macio	Método de micropoços
Frequência de mutação	$35 - 140 \times 10^{-6}$	$50 - 170 \times 10^{-6}$
Eficiência de clonagem	65 - 120 %	65 - 120 %
Crescimento da suspensão	8-32 vezes (tratamento de 3 a 4 horas) 32-180 vezes (tratamento de 24 horas, se realizado)	8-32 vezes (tratamento de 3 a 4 horas) 32-180 vezes (tratamento de 24 horas, se realizado)

58. No respeitante ao MLA, cada ensaio deve também ser avaliado quanto à questão de saber se o(s) controlo(s) positivo(s) satisfaz(em), pelo menos, um dos dois critérios de aceitação seguintes, definidos pelo grupo de trabalho do IWGT:
- O controlo positivo mostra um aumento absoluto da MF total, ou seja, um aumento em relação à MF espontânea [uma MF induzida (IMF)] de, pelo menos, 300×10^{-6} . Pelo menos 40 % da IMF deve refletir-se na MF da colónia.
 - O controlo positivo mostra um aumento da MF da colónia pequena de, pelo menos, 150×10^{-6} , em relação à observada na amostra de controlo não tratada ou do solvente paralela (uma pequena colónia IMF de 150×10^{-6}).
59. No caso do TK6, um ensaio é aceitável se o controlo negativo paralelo for considerado aceitável para adição à base de dados históricos de controlo negativo do laboratório, conforme descrito nos pontos 48 e 49. Além disso, os controlos positivos paralelos (ver ponto 32) devem induzir respostas compatíveis com as geradas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo paralelo.
60. Para ambos os ensaios, o limite superior de citotoxicidade observada na cultura de controlo positivo deve ser idêntico ao das culturas experimentais, ou seja, o RTG/RS não deve ser inferior a 10 %. Basta utilizar uma única concentração (ou uma das concentrações das culturas de controlo positivo, se se utilizar mais do que uma concentração) para demonstrar que os critérios de aceitação para o controlo positivo foram satisfeitos. Além disso, a MF do controlo positivo deve situar-se dentro da gama aceitável estabelecida para o laboratório.

Avaliação e interpretação dos resultados

61. No que se refere ao MLA, o Mouse Lymphoma Expert Workgroup do IWGT realizou um trabalho significativo sobre a importância biológica e os critérios de uma resposta positiva (4). Por conseguinte, o presente método de ensaio apresenta recomendações específicas para a interpretação dos resultados do produto químico em estudo do MLA (ver pontos 62-64). A base de dados do TK6 é muito mais reduzida e não foi avaliada por um grupo de trabalho. Por conseguinte, as recomendações para a interpretação dos dados para o TK6 são apresentadas em termos mais genéricos (ver pontos 65-66). Existem recomendações adicionais para ambos os ensaios (ver pontos 67-71).

MLA

62. Recomenda-se a adoção de uma abordagem para definir as respostas positivas e negativas, a fim de assegurar que o número acrescido de MF é biologicamente relevante. Em vez da análise estatística geralmente usada para outros ensaios, o presente baseia-se no recurso a uma frequência de mutação induzida predefinida (ou seja, um aumento da MF acima do controlo paralelo), designada «Fator de Avaliação Global» (GEF), baseada na análise da distribuição do controlo negativo dos dados sobre a MF dos laboratórios participantes (4). Para a versão do ágar do MLA, o GEF é de 90×10^{-6} e para a versão dos micropoços do MLA o GEF é de 126×10^{-6} .
63. Se se verificar que são cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, considera-se o produto químico em estudo inequivocamente positivo se, numa das condições de ensaio examinadas (ver ponto 33), o aumento da MF acima dos valores paralelos exceder o GEF e estiver relacionado com a concentração (por exemplo, utilizando uma análise de tendências). O produto químico em estudo é então considerado apto a induzir mutações, no contexto do sistema de ensaio.
64. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, considera-se o produto químico em estudo inequivocamente negativo se, em todas as condições de ensaio examinadas (ver ponto 33), não se verificar uma resposta relacionada com a concentração ou, caso se verifique um aumento da MF, este não exceder o GEF. Assim, o produto químico não é considerado passível de induzir mutações, no contexto do sistema de ensaio.

TK6

65. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, considera-se o produto químico em estudo inequivocamente positivo se, em qualquer das condições experimentais examinadas (ver ponto 33):

- pelo menos uma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,
- o aumento, avaliado com base numa análise de tendências adequada, depender da concentração (ver ponto 33),
- nenhum dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 48).

Se todos estes critérios forem preenchidos, considera-se o produto químico em estudo passível de induzir mutações no âmbito do presente sistema de ensaio. As referências bibliográficas (66) (67) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

66. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, em todas as condições experimentais examinadas (ver ponto 33):

- nenhuma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,
- não se observar qualquer aumento dependente da dose, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada.
- todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 48).

Nesse caso, considera-se que o produto químico não é passível de induzir mutações, no contexto do sistema de ensaio.

Para o MLA e o TK6:

67. Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deverá estar entre 20 % e 10 % do RTG/RS. É consensual que se deve ter cuidado ao interpretar os resultados positivos apenas entre 20 % e 10 % do RTG/RS e que um resultado não deve ser considerado positivo se o aumento da MF ocorrer apenas a 10 % do RTG/RS ou abaixo deste valor (se avaliado) (2) (59).

68. Em alguns casos, certas informações adicionais podem ajudar a determinar que um produto químico em estudo não é mutagénico, se não existir nenhuma cultura com um valor de RTG compreendido entre 10 e 20 % do RTG/RS. Estas situações definem-se do seguinte modo: (1) não há provas de mutagenicidade (por exemplo, inexistência de resposta às doses, de frequências de mutação acima das observadas nas gamas de controlo negativo paralelas ou históricas, etc.) numa série de pontos de dados compreendida entre 100 % e 20 % do RTG/RS, observando-se, pelo menos, um ponto de dados entre 20 % e 25 % do RTG/RS; (2) não há provas de mutagenicidade (por exemplo, inexistência de resposta às doses, de frequências de mutação acima das observadas nas gamas de controlo negativo paralelas ou históricas, etc.) numa série de pontos de dados entre 100 % e 25 % do RTG/RS, observando-se um ponto negativo ligeiramente inferior a 10 % do RTG/RS. Em ambas as situações, o produto químico em estudo pode ser considerado negativo.

69. Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta inequivocamente positiva ou negativa.

70. No caso de a resposta não ser inequivocamente positiva nem inequivocamente negativa, como se descreveu, e/ou para se tirarem conclusões quanto à importância biológica do resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou ser objeto de estudos complementares. Pode ser útil proceder a um ensaio de repetição, eventualmente alterando as condições experimentais (intervalo diferente entre as concentrações – para aumentar a probabilidade de atingir pontos de dados entre 10 e 20 % do RTG/RS –, condições de ativação metabólica diferentes – p. ex., concentração ou origem do S9 – e duração diferente do tratamento).

71. Em casos raros, mesmo após a realização de estudos complementares, os dados obtidos não permitem concluir por um resultado positivo ou negativo. Nessas circunstâncias, deve concluir-se que a resposta do produto químico em estudo é ambígua (interpretada como igualmente suscetível de ser positiva ou negativa).

RELATÓRIO DE ENSAIO

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

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;
- estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente, se conhecidas;
- medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substâncias multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Solvente:

- justificação da escolha do solvente;
- percentagem de solvente no meio de cultura final.

Células:

Para as culturas principais de laboratório:

- tipo e origem das células e antecedentes no laboratório de ensaio;
- características do cariótipo e/ou número modal de cromossomas.
- métodos de manutenção das culturas celulares;
- ausência de micoplasma;
- tempo de duplicação celular.

Condições de realização do ensaio:

- justificação da escolha das concentrações e do número de culturas de células, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade;

- composição dos meios, concentração de CO₂, nível de humidade;
- concentração do produto químico em estudo, expressa em concentração final no meio de cultura (p. ex., µg ou mg/ml ou mM do meio de cultura);
- concentração (e/ou volume) de solvente e de produto químico em estudo adicionada ao meio de cultura;
- temperatura de incubação;
- tempo de incubação;
- duração do tratamento;
- densidade celular durante a exposição;
- tipo e composição do sistema de ativação metabólica (fonte de S9, método de preparação da mistura de S9, concentração ou volume da mistura de S9 e de S9 no meio de cultura final, controlos de qualidade do S9);
- substâncias de controlo positivo e negativo, concentrações finais para cada condição de tratamento;
- duração do período de expressão (incluindo o número de células inoculadas e os calendários de subcultura e de alimentação, quando aplicável),
- identidade do agente seletivo e respetiva concentração;
- para o MLA, indicar a versão utilizada (ágar ou micropoço).
- critérios de aceitabilidade dos ensaios;
- métodos utilizados para a contagem das células mutantes e viáveis,
- métodos de medição da citotoxicidade;
- outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade e ao método utilizado;
- duração dos períodos de incubação após a colocação em placas;
- definição das colónias cuja dimensão e tipo são caracterizados (incluindo os critérios para a definição de colónias «pequenas» e «grandes», conforme apropriado).
- critérios para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo;
- métodos utilizados para determinar o pH, a pressão osmótica e a precipitação, se pertinente.

Resultados:

- número de células expostas e número de células subcultivadas para cada cultura;
- parâmetros de toxicidade (RTG para o MLA e RS para o TK6);
- sinais de precipitação e instante da determinação;
- número de células colocadas em placas em meio seletivo e não seletivo;

- número de colónias em meio não seletivo, número de colónias resistentes em meio seletivo e frequências de mutação conexas;
- definição do tamanho das colónias para os controlos negativos e positivos e, se o produto químico em estudo for positivo, pelo menos uma concentração e as frequências de mutação afins;
- relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;
- dados relativos aos controlos negativos (solvente) e controlos positivos (concentrações e solventes) realizados em paralelo;
- dados históricos sobre o controlo negativo (solvente) e positivo (concentrações e solventes), com as correspondentes gamas, médias e desvios-padrão; número de ensaios em que se baseiam os controlos históricos;
- análises estatísticas (para culturas individuais e replicados agrupados, se for caso disso) e valores p, caso existam; para o MLA, a avaliação GEF.

Discussão dos resultados

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 185-190.
- (2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292-299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: 127-140.
- (4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 1-5.
- (5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation. Res.*, 627 (1): 36-40.
- (6) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation Res.*, 746 (1): 21-28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy. *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. J. Environ. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/+} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System. *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History. *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFR) Mutants of L5178Y/TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.
- (15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.
- (16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 374 (1): 89-98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-14.
- (18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- (19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/+} -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium. *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- (22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.

- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.
- (25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185-190.
- (26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.
- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35-42.
- (32) Storer, R.D., Jaynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/-} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157-165.
- (33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- (34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.
- (35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162-176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12-15.
- (37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscrito em preparação).

- (38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- (39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261-287.
- (42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287-294.
- (43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.
- (44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.
- (45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83-90.
- (46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- (47) Ong T.M., *et al.* (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 (1): 55-65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- (51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and 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 (1): 51-59.
- (52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

- (53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooley K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.
- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and 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. Mutagen.*, 5 (6): 795-801.
- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122-130.
- (56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32-56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36-43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponível em: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): 373-384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363-378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): 9-17.
- (63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1-8.
- (64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87-90.
- (65) Ryan T.P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.
- (66) OCDE (2014). *Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines*. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Amostra de controlo não tratada: Cultura não sujeita a qualquer tratamento (com o produto químico em estudo ou solvente), mas processada do mesmo modo que as culturas tratadas com o produto químico em estudo.

Aneugénio: Produto ou processo químico que, por interação com os componentes do aparelho do ciclo mitótico e 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.

Citotoxicidade: No âmbito dos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio, a citotoxicidade é identificada como uma redução do crescimento relativo total (RTG) ou da sobrevivência relativa (RS) para, respetivamente, o MLA e o TK6.

Clastogénio: Produto ou processo químico que provoca aberrações cromossómicas estruturais em populações de células ou organismos.

Crescimento da suspensão (SG): Aumento do número de células durante as fases de tratamento e expressão do MLA. O SG é calculado multiplicando o aumento registado no dia 1, pelo aumento do dia 2 para o tratamento curto (3-4 horas). Se for utilizado um tratamento de 24 horas, o SG é o aumento durante o tratamento de 24 horas multiplicado pelos aumentos dos dias 1 e 2.

Crescimento relativo em suspensão (RSG): No caso do MLA, crescimento total relativo da cultura após dois dias em suspensão em comparação com o crescimento total do controlo negativo/de solvente em dois dias (Clive e Spector, 1975). O RSG deve incluir o crescimento relativo da cultura de ensaio em relação ao controlo negativo/de solvente durante o período de exposição.

Crescimento total relativo (RTG): Utilizado como medida da citotoxicidade do MLA decorrente do tratamento. É uma medida do crescimento relativo (em relação ao controlo do veículo) das culturas de ensaio durante as fases de tratamento, dois dias de expressão, seleção e clonagem de mutantes do ensaio. O RSG de cada cultura de ensaio é multiplicado pela eficiência relativa de clonagem da cultura de ensaio no momento da seleção de mutantes e expresso em relação à eficiência de clonagem da amostra de controlo negativo/solvente (Clive e Spector, 1975).

Controlo do solvente: Termo geral que define as culturas de controlo tratadas apenas com o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo.

Eficiência de clonagem: Percentagem de células incubadas em placas em baixa densidade que consegue originar uma colónia que pode ser contada.

Frações de fígado S9: Sobrenadante após centrifugação a 9 000 g do homogeneizado hepático (extrato de fígado em bruto).

Frequência de mutação (MF): Relação entre o número de células mutantes observadas e o número de células viáveis.

Genotóxico: Termo geral que abrange todos os tipos de danos ao ADN ou aos cromossomas, incluindo quebra do ADN, aduções, rearranjos, mutações, aberrações cromossómicas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossómicos estáveis.

Mistura S9: Mistura da fração de fígado S9 e dos cofatores necessários à atividade enzimática metabólica.

Mutação para diante: Uma mutação genética do tipo parental para a forma mutante que causa uma alteração ou perda de atividade enzimática da função da proteína codificada.

Mutagêneos por deslocação do quadro de leitura: Produtos químicos que causam a adição ou supressão de um par de bases ou de uma sequência de pares de bases do ADN.

Mutagêneos por substituição de um par de bases: Produtos químicos que causam a substituição de pares de bases do ADN.

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

Período de expressão fenotípica: Período após o tratamento durante o qual a modificação genética é fixada no genoma e os produtos dos genes inalterados se esgotam ao ponto de alterar o carácter fenotípico.

Produto químico: uma substância ou mistura.

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

Recombinação mitótica: Recombinação entre cromátídeos homólogos durante a mitose, eventualmente resultante na indução de quebras em cadeias duplas do ADN ou numa perda de heterozigotia.

Sobrevivência relativa (RS): Utilizada para medir a citotoxicidade do TK6 decorrente da exposição. Consiste na eficiência de clonagem (CE) relativa de células colocadas em placas imediatamente após o tratamento, ajustada por qualquer perda de células durante o tratamento, em comparação com a eficiência de clonagem do controlo negativo.

Apêndice 2

FÓRMULAS

Citotoxicidade

Para ambas as versões do MLA (ágar e micropoço)

A citotoxicidade é definida como o crescimento total relativo (RTG), que abrange o crescimento relativo em suspensão (RSG) durante o período de expressão de 2 dias e a eficiência de clonagem relativa (RCE) obtida no momento da seleção de mutantes. O RTG, a RSG e a RCE são expressos em percentagem.

Cálculo da RSG: O crescimento em suspensão 1 (SG_1) é a taxa de crescimento entre o dia 0 e o dia 1 (concentração celular no dia 1 / concentração celular no dia 0); o crescimento em suspensão dois (SG_2) é a taxa de crescimento entre o dia 1 e o dia 2 (concentração celular no dia 2 / concentração celular no dia 1). O RSG é o SG total ($SG_1 \times SG_2$) da cultura tratada em relação ao controlo sem tratamento/do solvente. Ou seja: $RSG = [SG_{1(ensaio)} \times SG_{2(ensaio)}] / [SG_{1(controlo)} \times SG_{2(controlo)}]$ O SG_1 deve ser calculado a partir da concentração inicial de células utilizada no início do tratamento celular. Quantifica qualquer citotoxicidade diferencial que ocorra na(s) cultura(s) de ensaio durante o tratamento das células.

A RCE é a eficiência relativa de clonagem da cultura de ensaio comparada com a eficiência relativa de clonagem da amostra de controlo não tratada/de solvente obtida no momento da seleção de mutantes.

Crescimento total relativo (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Sobrevivência relativa (RS):

A citotoxicidade é avaliada pela sobrevivência relativa, ou seja, a eficiência de clonagem (CE) de células colocadas em placas imediatamente após o tratamento, ajustada por eventuais perdas de células durante este, em comparação com a eficiência de clonagem nos controlos negativos (sobrevivência de 100 %). O ajustamento pela perda de células durante o tratamento é calculado do seguinte modo:

$$CE \text{ ajustado} = CE \times \frac{\text{Número de células no final do tratamento}}{\text{Número de células no início do tratamento}}$$

A RS de uma cultura tratada pelo produto químico em estudo é calculada do seguinte modo:

$$RS = \frac{CE \text{ ajustado da cultura tratada}}{CE \text{ ajustado do controlo do solvente}} \times 100$$

Frequência de mutação para o MLA e o ML6

A frequência de mutação (MF) é a eficiência de clonagem de colónias mutantes em meio seletivo (CE_M) ajustada pela eficiência de clonagem em meio não seletivo no momento da seleção de mutantes (CE_V). Ou seja, $MF = CE_M / CE_V$. O cálculo destas duas eficiências de clonagem para os métodos de clonagem do ágar e dos micropoços é descrito a seguir.

MLA versão ágar: Na versão de ágar macio do MLA, o número de colónias na placa de seleção de mutantes (C_M) e o número de colónias na placa de não seleção ou de eficiência da clonagem (contagem viável) (C_V) são obtidos através da contagem direta dos clones. Quando houver 600 células em placas para eficiência de clonagem (CE) para a seleção de mutantes (CE_M) e as placas não selecionadas ou de eficiência de clonagem (contagem viável) (CE_V) e 3×10^6 células forem utilizadas para a seleção de mutantes,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA e TK6 versão micropoços: Na versão micropoços dos MLA, a C_M e a C_V são definidas como o produto do número total de micropoços (TW) e o número provável de colónias por poço (P) nas placas de micropoços.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

A partir do termo zero da distribuição de Poisson (Furth *et al.*, 1981), o P é dado por

$$P = - \ln (EW / TW)$$

Em que EW são os poços vazios e TW são os poços totais. Portanto,

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Para a versão micropoços do MLA, as frequências de mutação das colónias pequenas e grandes serão calculadas de modo idêntico, utilizando o número de poços vazios tanto para as pequenas como para as grandes colónias.

No caso do TK6, as frequências de mutação das pequenas e grandes colónias baseiam-se nos mutantes precoces e tardios.

B.68 MÉTODO DE ENSAIO IN VITRO DE EXPOSIÇÃO DE CURTA DURAÇÃO PARA IDENTIFICAR i) PRODUTOS QUÍMICOS INDUTORES DE LESÕES OCULARES GRAVES E ii) PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITAM DE SER CLASSIFICADOS EM TERMOS DE IRRITAÇÃO OCULAR NEM DE LESÕES OCULARES GRAVES

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 491 (2017) da OCDE. O método de ensaio de exposição de curta duração (STE) é um método *in vitro* que pode ser utilizado, em determinadas circunstâncias e com limitações específicas, para a classificação e rotulagem de perigo de produtos químicos (substâncias e misturas) que provoquem danos oculares graves, bem de produtos químicos que não necessitem de classificação no que diz respeito quer a lesões oculares graves quer a irritação ocular, tal como definido no Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e no Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) (1).
2. Durante muitos anos, o potencial de perigosidade ocular dos produtos químicos foi avaliado essencialmente com recurso a um ensaio ocular *in vivo* no coelho (método de ensaio B.5 (8), equivalente à *Test Guideline* 405 da OCDE). É geralmente aceite que, num futuro previsível, nenhum ensaio *in vitro* alternativo isolado poderá substituir integralmente o ensaio ocular *in vivo* no coelho por forma a prever toda a gama de reações de lesões oculares graves ou irritação ocular das diferentes classes de produtos químicos. No entanto, combinações estratégicas de métodos de ensaio alternativos utilizados numa estratégia de ensaio (sequencial) podem conseguir substituir integralmente o ensaio ocular no coelho (2). A abordagem descendente foi concebida para o ensaio de produtos químicos que, previsivelmente, com base nas informações existentes, têm um elevado potencial de irritação ou de indução de lesões oculares graves. Por outro lado, a abordagem ascendente foi concebida para o ensaio de produtos químicos que, previsivelmente, com base nas informações existentes, não causam irritação ocular suficiente para deverem ser classificadas. Embora não se considere um substituto integral do ensaio ocular *in vivo* no coelho, o método de ensaio STE é adequado para ser utilizado, no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial para a classificação e rotulagem regulamentares, como a abordagem descendente/ascendente, para identificar, sem ensaios complementares: i) produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE); ii) produtos químicos (excluindo substâncias altamente voláteis e todos os sólidos não tensoativos) que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves (nenhuma categoria do sistema GHS da ONU/CRE) (1) (2). No entanto, para se estabelecer uma classificação definitiva de um produto químico que, previsivelmente, não provoque lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE) ou não pertença a nenhuma categoria GHS da ONU/CRE (não induz lesões oculares graves nem irritação ocular) de acordo com o método de ensaio STE, será necessário realizar ensaios complementares. Além disso, as entidades reguladoras competentes devem ser consultadas antes de se utilizar a STE numa abordagem ascendente ao abrigo de outros sistemas de classificação que não o GHS da ONU/CRE. A escolha do método de ensaio mais adequado e a utilização do presente método de ensaio devem ser vistos no contexto do documento de orientação da OCDE sobre as abordagens integrada de ensaio e avaliação de lesões oculares graves e de irritação ocular (14).
3. O presente método de ensaio tem por objetivo descrever os procedimentos utilizados para avaliar o potencial de perigosidade ocular de um produto químico em estudo, com base na sua capacidade de induzir a citotoxicidade no método de ensaio de exposição de curta duração. Os efeitos citotóxicos dos produtos químicos nas células epiteliais da córnea são modos de ação (MOA) importantes que conduzem à deterioração do epitélio da córnea e à irritação ocular. No método STE, a viabilidade celular é avaliada através da medição quantitativa, após extração a partir de células, de sal azul de formazano produzido pelas células vivas através da conversão enzimática do corante vital MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], também conhecido como brometo de tiazolilo e azul de tetrazólio (3). A viabilidade celular obtida é comparada com o controlo do solvente (viabilidade relativa) e utilizada para estimar o risco ocular potencial do produto químico em estudo. Este é classificado na categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE quando concentrações de 5 % e 0,05 % resultam numa viabilidade celular igual ou inferior a 70 %. Inversamente, um produto químico é classificado como pertencente a «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU/CRE quando concentrações de 5 % e 0,05 % resultam numa viabilidade celular superior a 70 %.
4. A expressão «produto químico em estudo» é utilizada no presente método de ensaio para referir o produto que está a ser estudado, não remetendo para a aplicabilidade do método de ensaio STE ao estudo de substâncias e/ou misturas. Para definições, consultar o apêndice.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

5. O presente método de ensaio baseia-se num protocolo desenvolvido pela Kao Corporation (4) que foi objeto de dois estudos de validação diferentes: um do Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal

(1) 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).

Experiments (JSAAE) (5) e outro do Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). Com base nos relatórios dos estudos de validação e nos documentos-base de recensão sobre o método de ensaio (7), o NICEATM/ICCVAM realizou uma avaliação por pares.

6. Quando utilizados para identificar produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE) (1), os dados obtidos com o método de ensaio STE em 125 produtos químicos (incluindo substâncias e misturas) apresentaram uma exatidão global de 83 % (104/125), uma taxa de falsos positivos de 1 % (1/86) e uma taxa de falsos negativos de 51 % (20/39) em relação ao ensaio ocular *in vivo* no coelho (7). A taxa de falsos negativos obtida não é crítica no atual contexto, uma vez que todos os produtos químicos que induzem uma viabilidade celular igual ou inferior a 70 % a uma concentração de 5 % e uma viabilidade celular superior a 70 % a uma concentração de 0,05 % são depois estudados por outros métodos de ensaio *in vitro* devidamente validados ou, como última opção, no ensaio ocular *in vivo* no coelho, consoante os requisitos regulamentares e em conformidade com a estratégia de ensaio sequencial e com as abordagens de ponderação da suficiência da prova atualmente recomendadas (1) (8). Foram ensaiadas, principalmente, substâncias monocomponentes, embora exista também uma quantidade limitada de dados sobre o ensaio de misturas. Considera-se, porém, que o método é tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multicomponentes. Contudo, antes da sua aplicação a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. O método de ensaio STE não revelou quaisquer outras deficiências específicas quando utilizado para identificar produtos químicos em estudo como pertencentes à categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE. Os investigadores podem ponderar a utilização do presente método de ensaio com produtos químicos em estudo em que uma viabilidade celular ≤ 70 %, tanto numa concentração de 5 % como numa concentração de 0,05 %, deve ser aceite como indicativa de uma resposta que induz danos oculares graves, que devem ser classificados na categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE, sem mais ensaios.
7. Quando utilizados para identificar produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (nenhuma categoria do sistema GHS da ONU/CRE), os dados obtidos com o método de ensaio STE em 130 produtos químicos (incluindo substâncias e misturas) apresentaram uma exatidão global de 85 % (110/130), uma taxa de falsos positivos de 12 % (9/73) e uma taxa de falsos negativos de 19 % (11/57) em relação ao ensaio ocular *in vivo* no coelho (7). Se se excluirmos do conjunto de dados as substâncias altamente voláteis e as substâncias sólidas não tensioativas, a exatidão global sobe para 90 % (92/102), a taxa de falsos negativos desce para 2 % (1/54) e a de falsos positivos para 19 % (9/48) (7). Assim, as possíveis deficiências do método de ensaio STE, quando utilizado para identificar produtos químicos em estudo que não necessitem de classificação em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves (nenhuma categoria no sistema GHS da ONU/CRE), consistem numa elevada taxa de falsos negativos para: i) substâncias altamente voláteis com uma pressão de vapor superior a 6 kPa; ii) produtos químicos sólidos (substâncias e misturas), com exceção dos tensioativos e das misturas constituídas apenas por tensioativos. Estes produtos químicos estão excluídos do domínio de aplicabilidade do método de ensaio STE (7).
8. Além dos produtos químicos referidos nos pontos 6 e 7, o conjunto de dados gerado pelo método de ensaio STE contém também dados obtidos internamente relativos a 40 misturas, que, em comparação com o ensaio ocular de Draize *in vivo*, revelaram, na avaliação de misturas que não necessitam de classificação nos sistemas de classificação GHS da ONU/CRE (9), uma exatidão de 88 % (35/40), uma taxa de falsos positivos de 50 % (5/10) e uma taxa de falsos negativos de 0 % (0/30). Por conseguinte, o método de ensaio STE pode ser aplicado para identificar misturas como não pertencentes a nenhuma categoria no sistema GHS da ONU/CRE, numa abordagem ascendente, excluindo-se as misturas sólidas que não sejam constituídas apenas por tensioativos, na esteira da limitação relativa a substâncias sólidas. Além disso, as misturas que contenham substâncias com uma pressão de vapor superior a 6kPa devem ser avaliadas com precaução, a fim de evitar eventuais subavaliações, devendo a sua avaliação ser justificada caso a caso.
9. O método de ensaio STE não pode ser utilizado para identificar produtos químicos em estudo como pertencentes à categoria 2, à categoria 2A (irritação ocular) ou à categoria 2B (irritação ocular suave) do sistema GHS da ONU/CRE, devido ao número considerável de produtos químicos da categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE subavaliados como pertencentes às categorias 2, 2A ou 2B e de produtos químicos não pertencentes a nenhuma categoria do GHS da ONU/CRE sobreavaliados como pertencentes às categorias 2, 2A ou 2B (7). Nesses casos, podem ser necessários ensaios complementares por outro método que seja adequado.

10. O método de ensaio STE é adequado para o ensaio de produtos químicos dissolvidos ou suspensos uniformemente durante, pelo menos, 5 minutos em soro fisiológico, de solução salina de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 % ou em óleo mineral. Não é adequado para o ensaio de produtos químicos insolúveis ou que não possam ser suspensos uniformemente durante, pelo menos, 5 minutos em soro fisiológico, solução salina de DMSO a 5 % ou em óleo mineral. A utilização de óleo mineral no método de ensaio STE é possível devido à exposição de curta duração. Por conseguinte, o método é adequado para prever o potencial de perigosidade ocular de produtos químicos em estudo insolúveis na água (p. ex., álcoois gordos de cadeia longa ou cetonas), desde que sejam miscíveis em, pelo menos, um dos três solventes supramencionados (4).
11. A expressão «produto químico em estudo» utilizada no presente método de ensaio designa o produto que está a ser estudado ⁽¹⁾, não abrangendo a aplicabilidade do método de ensaio STE ao ensaio de substâncias e/ou misturas.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

12. O método de ensaio STE é um ensaio de toxicidade *in vitro* realizado numa única camada confluyente de células Statens Seruminstitut Cornea (SIRC) cultivadas numa microplaca de policarbonato com 96 poços (4). Após cinco minutos de exposição ao produto químico em estudo, a citotoxicidade é medida quantitativamente como a viabilidade relativa das células SIRC, por recurso ao ensaio do MTT (4). A viabilidade celular reduzida é utilizada para prever potenciais efeitos nocivos indutores de danos oculares.
13. Encontra-se referenciado que 80 % de uma solução que caia no olho de um coelho são excretados através do saco conjuntival nos três-quatro minutos seguintes, enquanto mais de 80 % de uma solução que caia no olho humano são excretados em 1 a 2 minutos (10). O método de ensaio STE procura aproximar estes tempos de exposição e utiliza a citotoxicidade como parâmetro para avaliar a extensão dos danos causados às células SIRC após cinco minutos de exposição ao produto químico em estudo.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA

14. Antes de utilizarem de forma rotineira o método de ensaio STE descrito, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, classificando corretamente as onze substâncias recomendadas no quadro 1. Estas substâncias foram selecionadas para representar a gama completa de reações de lesão ocular grave ou irritação ocular com base nos resultados de ensaios oculares *in vivo* no coelho (TG 405) e no sistema de classificação GHS da ONU/CRE (1). Outros critérios de seleção incluíam a disponibilidade comercial das substâncias, a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade e a existência de dados *in vitro* de alta qualidade relativos ao método de ensaio STE (3). Nas situações em que uma substância incluída na lista esteja indisponível ou sempre que se justifique, podem utilizar-se outras substâncias para as quais estejam disponíveis dados de referência *in vivo* e *in vitro* adequados, desde que se apliquem os critérios descritos.

Quadro 1

Lista de substâncias para demonstração de competência técnica

Substância	N.º CAS	Classe química ⁽¹⁾	Estado físico	Cat. <i>in vivo</i> do GHS da ONU/CRE ⁽²⁾	Solvente no ensaio STE	Categoria STE do GHS da ONU/CRE
Cloreto de benzal-cónio (sol. aquosa a 10 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquido	Categoria 1	Salino	Categoria 1

⁽¹⁾ Em junho de 2013, a reunião conjunta acordou que, sempre que possível, nos métodos de ensaio novos e atualizados, a expressão «produto químico em estudo» deveria, passar a ser utilizada de forma mais coerente, para descrever o objeto do estudo.

Substância	N.º CAS	Classe química (¹)	Estado físico	Cat. in vivo do GHS da ONU/CRE (²)	Solvente no ensaio STE	Categoria STE do GHS da ONU/CRE
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Éter	Líquido	Categoria 1	Salino	Categoria 1
Vermelho ácido 92	18472-87-2	Composto heterocíclico; composto de bromo; composto de cloro	Sólido	Categoria 1	Salino	Categoria 1
Hidróxido de sódio	1310-73-2	Alcalinos; produtos químicos inorgânicos	Sólido	Categoria 1 (³)	Salino	Categoria 1
Butirolactona	96-48-0	Lactona; composto heterocíclico	Líquido	Categoria 2A (categoria 2 do CRE)	Salino	Previsão impossível
1-Octanol	111-87-5	Álcool	Líquido	Categoria 2A/B (⁴)(categoria 2 do CRE)	Óleos minerais	Previsão impossível
Ciclopentanol	96-41-3	Álcool; Hidrocarboneto cíclico	Líquido	Categoria 2A/B (⁵) (categoria 2 do CLP)	Salino	Previsão impossível
Acetato de 2-etoxietilo	111-15-9	Álcool; éter	Líquido	Nenhuma categoria	Salino	Nenhuma categoria
Dodecano	112-40-3	Hidrocarboneto acíclico	Líquido	Nenhuma categoria	Óleos minerais	Nenhuma categoria
Metilisobutilcetona	108-10-1	Cetona	Líquido	Nenhuma categoria	Óleos minerais	Nenhuma categoria

Substância	N.º CAS	Classe química ⁽¹⁾	Estado físico	Cat. <i>in vivo</i> do GHS da ONU/CRE ⁽²⁾	Solvente no ensaio STE	Categoria STE do GHS da ONU/CRE
Sulfato de 1,1-dimetilguanidina	598-65-2	Amidina; composto de enxofre	Sólido	Nenhuma categoria	Salino	Nenhuma categoria

⁽¹⁾ As classes de produtos químicos foram atribuídas com recurso a informações obtidas de publicações anteriores do NICEATM e, se não disponíveis, com recurso à National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH[®]) (via ChemIDplus[®] [National Library of Medicine], disponível em <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>), bem como às determinações estruturais efetuadas pelo NICEATM.

⁽²⁾ Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (*Test Guideline* 405 da OCDE) e utilizando o sistema GHS da ONU/CRE (1).

⁽³⁾ A classificação na cat. 1 é baseada no potencial de corrosão da pele de 100 % do hidróxido de sódio (apresentado como um produto químico para demonstração de competência técnica com potencial de corrosão da pele na *Test Guideline* 435 da OCDE) e nos critérios aplicáveis à categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE (1).

⁽⁴⁾ A classificação como categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas duas categorias; isto é, 2 em 6 ou 4 em 6 animais com efeitos no 7.º dia necessários para uma classificação na categoria 2A. O conjunto de dados *in vivo* incluiu 2 estudos com 3 animais cada um. Num estudo, dois dos três animais revelaram efeitos no sétimo dia que justificaram a classificação na cat. 2A (11), enquanto no segundo estudo todos os parâmetros dos três animais recuperaram para uma pontuação igual a zero até ao sétimo dia, o que justificou a classificação na cat. 2B (12).

⁽⁵⁾ A classificação na categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas categorias: se para a classificação na categoria 2A poder ser atribuída é necessário que 1 em 3 ou 2 em 3 animais exibam efeitos ao sétimo dia. O estudo *in vivo* incidiu em 3 animais. Num animal, todos os parâmetros, à exceção da opacidade da córnea e da vermelhidão da conjuntiva, recuperaram para uma pontuação igual a zero até ao dia 7 ou antes. O único animal que não recuperou completamente até ao dia 7 tinha uma pontuação de opacidade da córnea de 1 e uma vermelhidão da conjuntiva de 1 (no dia 7), que estavam completamente recuperadas no dia 14 (11).

Abreviaturas: N.º de registo CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

PROCEDIMENTO

Preparação da monocamada celular

- Para a realização do ensaio STE, deve utilizar-se a linha celular SIRC da córnea do coelho. Recomenda-se que as células SIRC provenham de um banco de células devidamente qualificado, como o American Type Culture Collection CCL60.
- As células SIRC são cultivadas a 37 °C, numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂, num balão de cultura com um meio de cultura constituído por meio mínimo essencial de Eagle (MEM) complementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, 50-100 unidades/ml de penicilina e 50-100 µg/ml de estreptomicina. As células que se tenham tornado confluentes no frasco de cultura devem ser separadas por meio da solução de tripsina-ácido etilenodiaminotetracético, com ou sem recurso a um raspador. As células são propagadas (2 a 3 passagens) num recipiente de cultura antes de serem utilizadas em ensaios de rotina, não devendo ser objeto de mais de 25 passagens desde a descongelação.
- As células prontas a utilizar no ensaio STE são preparadas à densidade adequada e inoculadas em placas de 96 poços. A densidade de inoculação das células recomendada é de $6,0 \times 10^3$ células por poço, se as células forem utilizadas quatro dias após a inoculação, ou de $3,0 \times 10^3$ células por poço, se forem utilizadas cinco dias após a inoculação, num volume de cultura de 200 µl. As células utilizadas para o ensaio STE que sejam inoculadas num meio de cultura com a densidade adequada atingirão uma confluência superior a 80 % no momento do ensaio, isto é, quatro ou cinco dias após a inoculação.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e de controlo

18. A primeira escolha do solvente para dissolução ou suspensão dos produtos químicos em estudo é uma solução de soro fisiológico. Se o produto apresentar uma baixa solubilidade ou não puder ser dissolvido ou suspenso uniformemente durante, pelo menos, cinco minutos em soro fisiológico, utiliza-se, como segunda opção, DMSO (n.º CAS 67-68-5) a 5 % em soro fisiológico. Caso os produtos químicos em estudo não possam ser dissolvidos ou suspensos de modo uniforme durante, pelo menos, cinco minutos em soro fisiológico ou em DMSO a 5 % em soro fisiológico, utiliza-se óleo mineral (n.º CAS 8042-47-5) como terceira opção.
19. Os produtos químicos em estudo são dissolvidos ou suspensos uniformemente no solvente selecionado, a uma concentração de 5 % (m/m), e novamente diluídos numa diluição sequencial de fator 10 até 0,5 % e uma concentração de 0,05 %. Cada produto químico em estudo deve ser ensaiado a concentrações de 5 % e 0,05 %. As células cultivadas na placa de 96 poços são expostas a 200 µl/poço de uma concentração da solução (ou suspensão) do produto químico em estudo de 5 % ou de 0,05 %, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os produtos químicos em estudo (substâncias monocomponentes ou substâncias ou misturas multicomponentes) são considerados substâncias puras, sendo diluídos ou suspensos de acordo com o método, independentemente do seu grau de pureza.
20. Utiliza-se como meio de controlo, em cada placa de cada réplica, o meio de cultura descrito no ponto 16. Além disso, as células devem ser expostas também a amostras de controlo de solvente em cada uma das placas de cada réplica. Está confirmado que os solventes enumerados no ponto 18 não têm efeitos nocivos na viabilidade das células SIRC.
21. No método de ensaio STE, utiliza-se uma solução salina a 0,01 % de laurilsulfato de sódio como controlo positivo em cada réplica. A fim de calcular a viabilidade celular do controlo positivo, cada placa de cada réplica deve incluir também um controlo do solvente salino.
22. É necessário um ensaio em branco para determinar a compensação por densidade ótica, ensaio esse que deve ser realizado em poços contendo apenas solução salina tamponada de fosfatos (PBS), mas sem cálcio e magnésio (PBS-) nem células.
23. Cada amostra (produto químico em estudo a 5 % e 0,05 %, controlo de meio, controlo do solvente e controlo positivo) deve ser ensaiada em triplicado em cada réplica, expondo as células a 200 µl do produto químico em estudo ou de controlo, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.
24. As substâncias de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de produtos químicos desconhecidos de uma determinada classe química – ou classe de produtos – e para avaliar o potencial de irritação relativo de uma substância irritante ocular numa determinada gama de reações de irritação.

Medição da viabilidade celular

25. Após a exposição, as células são lavadas duas vezes com 200 µl de PBS e adicionam-se 200 µl de solução de MTT (0,5 mg de MTT/ml de meio de cultura). Após um período de reação de duas horas numa incubadora (37 °C, 5 % de CO₂), a solução de MTT é decantada, o MTT formazano é extraído durante 60 minutos através da adição de 200 µl de 0,04 N ácido clorídrico-isopropanol, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, medindo-se a absorvância da solução de MTT formazano a 570 nm, com um leitor de placas. A interferência de produtos químicos em estudo com o ensaio do MTT (por corantes ou redutores diretos do MTT) só ocorre se uma quantidade significativa do produto químico em estudo ficar retida no sistema de ensaio após a lavagem subsequente à exposição, o que acontece com córnea humana reconstruída em 3D ou com tecidos da epiderme humana reconstruídos, mas não é relevante para culturas de células 2D utilizadas para o método de teste STE.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

26. Utilizam-se os valores da densidade ótica (DO) obtidos para cada produto químico em estudo para calcular a viabilidade celular em relação ao controlo do solvente, que é fixada em 100 %. A viabilidade celular relativa é expressa em percentagem e obtida dividindo a densidade ótica do produto químico em estudo pela densidade ótica do controlo do solvente depois de subtrair a densidade ótica do produto em branco de ambos os valores.

$$\text{Viabil.cel. (\%)} = \frac{(\text{DO}_{570} \text{ prod.quím.estudo}) - (\text{DO}_{570} \text{ de vazio})}{(\text{DO}_{570} \text{ do controlo do solvente}) - (\text{DO}_{570} \text{ de vazio})} \times 100$$

Do mesmo modo, a viabilidade celular relativa de cada controlo de solvente é expressa em percentagem e obtida dividindo a densidade ótica do controlo do solvente pela densidade ótica do controlo do meio, após subtração da densidade ótica do branco a ambos os valores.

27. Devem realizar-se três repetições independentes, cada uma das quais com três poços replicados (ou seja, $n = 9$). A média aritmética dos três poços de cada produto químico em estudo e do controlo do solvente em cada réplica independente é utilizada para calcular a média aritmética da viabilidade celular relativa. A média aritmética final da viabilidade celular é calculada a partir das três repetições independentes.
28. Apresentam-se a seguir os valores-limite de viabilidade celular para a identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE) e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves (nenhuma categoria no sistema GHS da ONU/CRE).

Quadro 2

Modelo de previsão do método de ensaio STE

Viabilidade celular		Classificação GHS da ONU/CRE	Aplicabilidade
A 5 %	A 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Nenhuma categoria	Substâncias e misturas, com exceção de: i) Substâncias altamente voláteis com uma pressão de vapor superior a 6 kPa ⁽¹⁾ e ii) Produtos químicos sólidos (substâncias e misturas), com exceção dos tensoativos e das misturas constituídas apenas por tensoativos
≤ 70 %	> 70 %	Previsão impossível	Não aplicável
≤ 70 %	≤ 70 %	Categoria 1	Substâncias e misturas ⁽²⁾

⁽¹⁾ As misturas que contenham substâncias com uma pressão de vapor superior a 6 kPa devem ser avaliadas com precaução, a fim de evitar eventuais subavaliações, devendo a sua avaliação ser justificada caso a caso.

⁽²⁾ Com base nos resultados obtidos principalmente com substâncias monocomponentes, embora exista também uma quantidade limitada de dados sobre o ensaio de misturas. Considera-se, porém, que o método é tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multicomponentes. Antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se (e, em caso afirmativo, por que motivo) o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.

CrITÉRIOS de aceitação

29. Os resultados dos ensaios são considerados aceitáveis se forem cumpridos os seguintes critérios:

- a) A densidade ótica do controlo do meio (exposto ao meio de cultura) deve ser igual ou superior a 0,3 após dedução da densidade ótica do branco.

- b) A viabilidade do controlo do solvente deve ser igual ou superior a 80 % do controlo do meio. Caso se utilizem vários controlos de solvente em cada repetição, cada um desses controlos deve indicar uma viabilidade celular superior a 80 % para qualificar os produtos químicos em estudo ensaiados com esses solventes.
- c) A viabilidade celular obtida com o controlo positivo (0,01 % SLS) deve situar-se no intervalo de dois desvios-padrão da média histórica. Os limites superior e inferior de aceitação do controlo positivo devem ser atualizados com frequência, ou seja, de três em três meses ou sempre que se realize um ensaio aceitável num laboratório que efetue ensaios com pouca frequência (ou seja, menos de uma vez por mês). Caso um laboratório não realize um número de experiências suficiente para estabelecer uma distribuição de controlo positiva estatisticamente sólida, é aceitável que se utilizem os limites superior e inferior de aceitação estabelecidos pelo criador do método, ou seja, entre 21,1 % e 62,3 %, de acordo com os seus dados históricos de laboratório, enquanto uma distribuição interna é construída durante os primeiros ensaios de rotina.
- d) O desvio-padrão da viabilidade celular final derivado de três repetições independentes deve ser inferior a 15 % para as concentrações de 5 % e 0,05 % do produto químico em estudo.

Se um ou mais destes critérios não forem cumpridos, os resultados devem ser rejeitados e deve proceder-se a três novas repetições independentes.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

30. Devem comunicar-se os dados relativos a cada poço individual (por exemplo, valores de viabilidade celular) de cada repetição, bem como a média global, o DP e a classificação.

Relatório de ensaio

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

Produto químico em estudo e substâncias de controlo

- Substâncias monocomponentes: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) de registo CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos de identificação;
- Substância multicomponentes, UVCB e mistura: Caracterização, tanto quanto possível — por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;
- Estado físico, volatilidade, pH, log(P), peso molecular, classe química e outras propriedades físico-químicas pertinentes para a realização do estudo, na medida em que estejam disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Condições e procedimentos do método de ensaio

- Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo;
- Descrição do método de ensaio utilizado;

- Linha celular utilizada, origem, número de passagens e confluência das células utilizadas para o ensaio;
- Pormenores sobre o protocolo de ensaio seguido;
- Número de réplicas e replicados utilizados;
- Concentrações do produto químico em estudo utilizadas (se diferentes das recomendadas);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Tempo de exposição ao produto químico em estudo (se diferente do recomendado);
- Descrição de eventuais modificações do protocolo do ensaio;
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Referência à média histórica do controlo positivo e ao desvio-padrão (DP);
- Demonstração da competência técnica do laboratório para executar o método de ensaio (p. ex., ensaio de substâncias utilizadas para demonstrar a competência técnica) ou demonstração da reprodutibilidade do método de ensaio ao longo do tempo.

Resultados

- Para cada produto químico em estudo, cada substância de controlo e cada concentração estudada, deve apresentar-se uma tabela dos valores da densidade ótica por poço replicado, os valores da média aritmética da densidade ótica para cada repetição independente, a percentagem de viabilidade celular para cada repetição independente e a média aritmética final da percentagem de viabilidade celular das três repetições, bem como o desvio-padrão das três repetições;
- Resultados relativos ao meio, ao controlo do solvente e ao controlo positivo que demonstrem o cumprimento dos critérios pertinentes de aceitação do estudo;
- Descrição de outros efeitos eventualmente observados;
- Classificação global atribuída, com menção do modelo de previsão ou dos critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

- (3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- (5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- (6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1 855-1 869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Disponível em: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Chapter B.5 of this Annex, Acute Eye Irritation/Corrosion.
- (9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 648-1 653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.
- (12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442-449.
- (13) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Apêndice

DEFINIÇÕES

Abordagem ascendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos em estudo que se pense não necessitarem de ser classificados em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que não careçam de classificação (resultado negativo) a partir de outros produtos químicos (resultado positivo).

Abordagem descendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos em estudo que se suspeite causarem lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que induzam lesões oculares graves (resultado positivo) a partir de outros produtos químicos (resultado negativo).

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 apreciação. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (10).

Agente tensoativo: Produto químico, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial dos líquidos, permitindo-lhes formar espumas ou penetrar em sólidos; igualmente designado por «agente molhante».

Amostra de controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou excipiente, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou excipiente. Quando ensaiada com uma amostra de controlo do meio correspondente, esta amostra também permite determinar se o solvente ou o veículo interage com o sistema de ensaio.

Categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «lesão ocular grave».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «irritação ocular».

Controlo do meio: Replicado não tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com uma substância que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

DO: Densidade ótica.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados 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 (13).

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há dados suficientes para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se os dados existentes possibilitarem a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. No caso contrário, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

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 sua adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (13).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial (13).

Irritação ocular: Alteração ocular em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Esta expressão e as expressões «efeitos oculares reversíveis» ou «categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE» são utilizados indistintamente.

Lesão ocular grave: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão devido à aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação. Esta expressão e as expressões «efeitos oculares irreversíveis» ou «categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE» são utilizadas indistintamente.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]; brometo de tiazolilo; azul de tetrazólio.

Nenhuma categoria no sistema GHS da ONU/CRE: Produtos químicos não classificados nas categorias 1 ou 2 (ou categorias 2A ou 2B) do sistema GHS da ONU/CRE.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos num organismo, sistema, população ou subpopulação que seja exposto ao agente em causa.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

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

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam classificados em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (10).

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Sistema 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 correspondentes elementos de comunicação, 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).

Substância: Um elemento químico e os seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

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

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside no facto de a primeira ser obtida misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Taxa de falsos negativos: Proporção dos produtos químicos positivos que o método de ensaio considera, erradamente, negativos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção dos produtos químicos negativos que o método de ensaio considera, erradamente, positivos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou matérias biológicas.

B.69 MÉTODO DE ENSAIO DO EPITÉLIO HUMANO SIMILAR À CórNEA RECONSTRUÍDO (RhCE), PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITAM DE CLASSIFICAÇÃO E ROTULAGEM EM MATÉRIA DE IRRITAÇÃO OCULAR E LESÕES OCULARES GRAVES

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 492 (2017) da OCDE. Por *lesões oculares graves* entende-se a produção de lesões oculares graves ou uma degradação grave da visão, na sequência da aplicação de um produto químico na superfície anterior do olho, que não sejam totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação, de acordo com o Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (GHS) (1), e pelo Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ⁽¹⁾. Ainda de acordo com o sistema GHS da ONU e com o CRE, entende-se por *irritação ocular* a produção de alterações no olho, após a aplicação do produto químico em estudo na sua superfície anterior, que são totalmente reversíveis nos 21 dias seguintes à aplicação. Os produtos químicos em estudo que induzem lesões oculares graves são classificados na categoria 1 do sistema GHS da ONU e na categoria 1 do CRE, enquanto os que induzem irritação ocular são classificados na categoria 2 do sistema GHS da ONU e na categoria 2 do CRE. Os produtos químicos em estudo não classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves são definidos como produtos químicos que não preenchem os requisitos para classificação nas categorias 1 ou 2 (2A ou 2B) do sistema de classificação GHS da ONU/CRE, ou seja, são referidos como não pertencendo a «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU/CRE.
2. A avaliação das lesões oculares graves/irritação ocular implica, normalmente, a utilização de animais de laboratório (método de ensaio B.5) (2). A escolha do método de ensaio mais adequado e a utilização do presente método de ensaio devem ser ponderadas no contexto do documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação de lesões oculares graves e de irritação ocular (39).
3. O presente método de ensaio descreve um procedimento *in vitro* que permite a identificação de produtos químicos (substâncias e misturas) que não necessitam de classificação e rotulagem em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, em conformidade com o GHS da ONU e com o CRE. Utiliza epitélio humano reconstruído similar à córnea (RhCE), o qual reproduz com rigor as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do epitélio da córnea humana. Quatro outros métodos de ensaio *in vitro* foram validados, considerados cientificamente válidos e adotados como métodos de ensaio B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) e B.68 (6), a fim de resolver a questão do parâmetro «lesões oculares graves/irritação ocular».
4. O presente método inclui dois ensaios validados, comercialmente disponíveis, de RhCE. Realizaram-se estudos de validação para avaliar irritação ocular/lesões oculares graves (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) utilizando os ensaios de irritação ocular EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) e SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Cada um destes testes utiliza, como sistema de ensaio, construções de tecido RhCE disponíveis no comércio, a seguir referidas como métodos de referência validados – VRM1 e VRM2, respetivamente. A partir destes estudos de validação e da sua avaliação independente por pares (9)(12), concluiu-se que o IET EpiOcular™ e o HCE IET SkinEthic™ permitem identificar corretamente os produtos químicos (substâncias e misturas) que, de acordo com o GHS da ONU, não necessitam de classificação e rotulagem em matéria de irritação ocular ou de lesões oculares graves, tendo os ensaios sido recomendados como cientificamente válidos para o efeito (13).
5. É geralmente aceite que, num futuro previsível, nenhum ensaio *in vitro* alternativo isolado poderá substituir integralmente o ensaio ocular pelo método de Draize *in vivo* (2) (14) para prever toda a gama de reações de lesões oculares graves/irritação ocular das diferentes classes de produtos químicos. Porém, a combinação de vários métodos de ensaio alternativos no âmbito de uma estratégia de ensaio ascendente/descendente pode substituir-se ao ensaio ocular pelo método de Draize (15). A abordagem ascendente (15) foi concebida para ser utilizada quando, com base nos dados existentes, se preveja que um produto químico não cause irritação ocular suficiente para necessitar de ser classificado, enquanto a abordagem descendente (15) é concebida para ser utilizada quando, com base nos dados existentes, se preveja que um produto químico cause lesões oculares graves. O EIT EpiOcular™ e o EIT HCE SkinEthic™ são recomendados para a identificação de produtos químicos que não necessitam de classificação para irritação ou lesões oculares graves de acordo com o GHS da ONU/CRE (nenhuma categoria) sem qualquer outro ensaio, no âmbito de uma estratégia como a abordagem ascendente/descendente sugerida por Scott *et al.*, por exemplo, como uma etapa

⁽¹⁾ 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).

inicial de uma abordagem ascendente ou como uma das últimas etapas de uma abordagem descendente (15). No entanto, o EIT EpiOcular™ e o EIT HCE SkinEthic™ não se destinam a estabelecer uma distinção entre a categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE (lesões oculares graves) e a categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE (irritação ocular). Esta diferenciação terá de ser feita a outro nível da estratégia de ensaio (15). No caso de produtos químicos em estudo identificados como necessitando de classificação para a irritação ocular/lesões oculares graves com o EIT EpiOcular™ ou o EIT HCE SkinEthic™ será, por conseguinte, necessário realizar ensaios complementares (*in vitro* e/ou *in vivo*) para se chegar a uma conclusão definitiva (nenhuma categoria, categoria 2 ou categoria 1 no sistema GHS da ONU/CRE), utilizando, por exemplo, os métodos B.47, B.48, B.61 ou B.68.

6. O presente método de ensaio tem por objetivo descrever o procedimento utilizado para avaliar o potencial de perigosidade ocular de um produto químico em estudo, com base na sua capacidade de induzir a citotoxicidade num tecido RhCE, medido pelo ensaio do MTT (16) (ver ponto 21). A viabilidade do tecido RhCE na sequência da exposição a um produto químico em estudo é determinada em relação aos tecidos tratados com a substância de controlo negativa (taxa de viabilidade em %) e é utilizada para prever o potencial de perigosidade ocular do produto em causa.
7. Existem normas de desempenho (17) para facilitar a validação de ensaios *in vitro*, novos ou modificados, baseados no RhCE, semelhantes ao EIT EpiOcular™ e ao EIT HCE SkinEthic™, em conformidade com os princípios do documento de orientação n.º 34 da OCDE (18), e permitir a alteração oportuna da *Test Guideline* 492 da OCDE, para que possa abranger os referidos ensaios. A aceitação mútua de dados (MAD) nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida para métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho, se tiverem sido revistos e incluídos na correspondente diretriz de ensaio da OCDE.

DEFINIÇÕES

8. O apêndice 1 contém definições.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

9. O presente método de ensaio baseia-se em tecidos RhCE tridimensionais disponíveis no comércio que são produzidos utilizando queratinócitos primários de epiderme humana (OCL-200 da EpiOcular™) ou células epiteliais da córnea humana imortalizadas (HCE/S da SkinEthic™). Os tecidos RhCE OCL-200 da EpiOcular™ e HCE/S da SkinEthic™ são similares à estrutura tridimensional do epitélio corneano *in vivo* e são produzidos utilizando células da espécie-alvo (19)(20). Além disso, os ensaios medem diretamente a citotoxicidade resultante da penetração do produto químico através da córnea e a produção de danos nas células e nos tecidos; a resposta citotóxica determina *in vivo* as lesões oculares graves/a irritação ocular totais resultantes. Os danos nas células podem ocorrer através de vários modos de ação (ver ponto 20), mas a citotoxicidade desempenha um papel mecanístico importante – se não essencial – na determinação da resposta global, em termos de lesões oculares graves/irritação ocular, a um produto químico, expressa *in vivo* principalmente por opacidade da córnea, irite, vermelhidão da conjuntiva e/ou equimose conjuntival, independentemente dos processos físico-químicos subjacentes aos danos dos tecidos.
10. Uma vasta gama de produtos químicos, que abrange uma grande diversidade de produtos químicos, classes químicas, pesos moleculares, log(P), estruturas químicas, etc., foi ensaiada no estudo de validação subjacente ao presente método de ensaio. A base de dados de validação do EIT EpiOcular™ contém um total de 113 produtos químicos, que abrangem 95 grupos funcionais orgânicos diferentes, de acordo com uma análise da caixa de ferramentas da QSAR Toolbox da OCDE (8). A maioria destes produtos químicos representa substâncias monocomponentes, mas várias substâncias multicomponentes (incluindo 3 homopolímeros, 5 copolímeros e 10 quase-polímeros) foram igualmente incluídas no estudo. No que respeita ao estado físico e às categorias do sistema GHS da ONU, os 113 produtos químicos objeto de ensaio foram distribuídos do seguinte modo: 13 líquidos da categoria 1, 15 sólidos da categoria 1, 6 líquidos da categoria 2A, 10 sólidos da categoria 2A, 7 líquidos da categoria 2B, 7 sólidos da categoria 2B, 27 líquidos de nenhuma categoria e 28 sólidos de nenhuma categoria (8). A base de dados do EIT HCE da SkinEthic™ contém um total de 200 produtos químicos, que abrangem 165 grupos funcionais orgânicos diferentes (8) (10) (11). A maioria destes produtos químicos representava substâncias monocomponentes, mas várias substâncias multicomponentes (incluindo 10 polímeros) foram igualmente incluídas no estudo. No que respeita ao estado físico e às categorias do sistema GHS da ONU, os 200 produtos químicos objeto de ensaio foram distribuídos do seguinte modo: 27 líquidos da categoria 1, 24 sólidos da categoria 1, 19 líquidos da categoria 2A, 10 sólidos da categoria 2A, 7 líquidos da categoria 2B, 8 sólidos da categoria 2B, 50 líquidos de nenhuma categoria e 53 sólidos de nenhuma categoria (10) (11).

11. O método é aplicável a substâncias e misturas, 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 moídos em pó fino antes da aplicação; não é necessário nenhum outro tratamento prévio da amostra. O estudo de validação não incidiu em gases e aerossóis. Embora se admita que uns e outros possam ser ensaiados recorrendo à tecnologia RhCE, a versão atual do método não está vocacionada para ensaios de gases nem de aerossóis.
12. Os produtos químicos em estudo que absorvem a luz na gama do MTT formazano (naturalmente ou após tratamento) e os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o corante vital MTT (a MTT formazano) podem interferir com as medições da viabilidade dos tecidos e requerer a realização de controlos adaptados para correção. O tipo de controlos adaptados que podem ser requeridos varia em função do tipo de interferência produzida pelo produto químico em estudo e do procedimento utilizado para quantificar o MTT formazano (ver pontos 36 a 42).
13. Os resultados obtidos nos estudos de pré-validação (21) (22) e de validação (8) (10) (11) demonstraram que tanto o EIT EpiOcular™ como o EIT HCE SkinEthic™ são transferíveis para laboratórios considerados pouco experientes na realização dos ensaios e são igualmente reprodutíveis, quer no mesmo laboratório quer em laboratórios diferentes. Com base nestes estudos, o nível de reprodutibilidade das previsões expectáveis para o EIT da EpiOcular™ a partir de dados relativos a 113 produtos químicos é da ordem de 95 % a nível intralaboratorial e de 93 % a nível interlaboratorial. O nível de reprodutibilidade em termos de concordância das previsões expectáveis para o EIT HCE da SkinEthic™ a partir de dados relativos a 120 produtos químicos é da ordem dos 92 % a nível intralaboratorial e de 95 % a nível interlaboratorial.
14. O EIT da EpiOcular™ pode ser utilizado para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU e com o CRE. Tendo em conta os dados obtidos no estudo de validação (8), o EIT da EpiOcular™ tem uma exatidão global de 80 % (com base em 112 produtos químicos), uma sensibilidade de 96 % (57 produtos químicos) uma taxa de falsos negativos de 4 % (com base em 57 produtos químicos), uma especificidade de 63 % (55 produtos químicos) e uma taxa de falsos positivos de 37 % (55 produtos químicos) comparativamente com dados do ensaio ocular *in vivo* no coelho – método de ensaio B.5 (2)(14) classificado de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU e com o CRE. Um estudo em que foram ensaiados com o EIT da EpiOcular™ 97 formulações de produtos agroquímicos líquidos demonstrou um desempenho do método de ensaio para este tipo de misturas similar ao obtido no estudo de validação (23). As 97 formulações distribuíram-se do seguinte modo: 21 da categoria 1, 19 da categoria 2A, 14 da categoria 2B e 43 sem categoria, classificadas de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU com base em dados de referência do ensaio ocular *in vivo* do coelho (método de ensaio B.5) (2)(14). Foi obtida uma exatidão global de 82 % (com base em 97 formulações), uma sensibilidade de 91 % (54 formulações), uma taxa de falsos negativos de 9 % (54 formulações), uma especificidade de 72 % (43 formulações) e uma taxa de falsos positivos de 28 % (43 formulações) (23).
15. O IET HCE da SkinEthic™ pode ser utilizado para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU e com o CRE. Tendo em conta os dados obtidos no estudo de validação (10) (11), o EIT HCE da SkinEthic™ tem uma exatidão global de 84 % (com base em 200 produtos químicos), uma sensibilidade de 95 % (97 produtos químicos) uma taxa de falsos negativos de 5 % (97 produtos químicos), uma especificidade de 72 % (103 produtos químicos) e uma taxa de falsos positivos de 28 % (103 produtos químicos) comparativamente com dados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (método de ensaio B.5 (2)(14) classificado de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU e com o CRE.
16. As taxas de falsos negativos obtida com ambos os ensaios RhCE, tanto para as substâncias como para as misturas, estão dentro dos 12 % de probabilidade de os produtos químicos serem identificados como pertencendo à categoria 2 ou a nenhuma do GHS da ONU e do CRE pelo ensaio ocular de Draize *in vivo*, em testes repetidos; ou seja, são

devidas à variabilidade intrínseca do método de ensaio (24). As taxas de falsos positivos obtidas com ambos os métodos de ensaio RhCE tanto com substâncias como com misturas não são críticas no contexto do presente método de ensaio, uma vez que todos os produtos químicos que produzem uma viabilidade dos tecidos igual ou inferior aos limites estabelecidos (ver ponto 44) requerem ensaios complementares por recurso a outros métodos de ensaio *in vitro*, ou, em último recurso, em coelhos, consoante os requisitos regulamentares, utilizando uma estratégia de ensaios sequenciais, numa abordagem de ponderação da suficiência da prova. Estes métodos podem ser usados para todos os tipos de produtos químicos, devendo um resultado negativo ser aceite para que não se classifique um produto químico em termos de irritação ocular e de lesões oculares graves (nenhuma categoria do GHS da ONU/CRE). Devem consultar-se as entidades reguladoras competentes antes da utilização do EIT da EpiOcular™ e do EIT HCE da SkinEthic™ quanto à aplicação de sistemas de classificação diferentes do GHS da ONU/CRE.

17. Uma limitação do presente método de ensaio reside no facto de não permitir distinguir irritação ocular/efeitos oculares reversíveis (categoria 2) e lesões oculares graves/efeitos oculares irreversíveis (categoria 1), definidos no sistema GHS da ONU e no CRE, nem entre irritantes oculares (categoria 2A facultativa) e irritantes oculares ligeiros (categoria 2B facultativa), definidos no sistema GHS da ONU (1). Para o efeito, são necessários ensaios complementares por recurso a outros métodos de ensaio *in vitro*.
18. A expressão «produto químico em estudo» é utilizada no presente método de ensaio refere-se ao objeto do estudo ⁽²⁾, não pressupondo a aplicabilidade do método de ensaio RhCE ao ensaio de substâncias e/ou misturas.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

19. O produto químico em estudo é aplicado localmente a um mínimo de dois sistemas tridimensionais de tecido RhCE, sendo a viabilidade dos tecidos medida após a exposição e um período de incubação subsequente ao tratamento. Os tecidos RhCE são reconstruídos a partir de queratinócitos primários da epiderme humana ou de células epiteliais da córnea humana imortalizadas, cultivadas durante vários dias para formar um epitélio escamoso, estratificado, altamente diferenciado e morfológicamente semelhante ao encontrado na córnea humana. O tecido RhCE da EpiOcular™ consiste em, pelo menos, três camadas viáveis de células e uma superfície não queratinizada, apresentando uma estrutura análoga à estrutura *in vivo*. O tecido HCE RhCE da SkinEthic™ consiste em, pelo menos, quatro camadas viáveis de células, incluindo células colunares basais, células transicionais aladas e células escamosas superficiais similares às do epitélio da córnea humana normal. (20) (26).
20. As lesões oculares graves, ou irritação ocular grave, induzidas por produtos químicos, que se manifestam *in vivo*, principalmente, por opacidade da córnea, irite, vermelhidão da conjuntiva e/ou equimose conjuntival, resultam de uma sucessão de eventos que se inicia com a penetração do produto químico na córnea e/ou na conjuntiva e a produção de danos nas células. Estes podem ocorrer por vários modos de ação, nomeadamente lise da membrana celular (caso, por exemplo, dos tensoativos e solventes orgânicos), coagulação macromolecular (sobretudo proteínas) (por exemplo, tensoativos, solventes orgânicos, ácidos e compostos alcalinos), saponificação de lípidos (por exemplo, por compostos alcalinos), interações de alquilação ou outras interações covalentes com macromoléculas (por exemplo, por descolorantes, peróxidos e alquiladores) (15) (27) (28). No entanto, ficou demonstrado que a citotoxicidade desempenha um papel mecânico importante, se não essencial, na determinação da resposta global a um produto químico, expressa em lesões oculares graves/irritação ocular, independentemente dos processos físico-químicos subjacentes aos danos nos tecidos (29) (30). Além disso, o potencial de lesões oculares graves/irritação ocular de um produto químico é principalmente determinado pela gravidade da lesão inicial (31), relacionada com a extensão da morte celular (29) e com a intensidade das respostas e eventuais resultados posteriores (32). Assim, de um modo geral, os irritantes leves apenas afetam o epitélio superficial da córnea, os irritantes ligeiros e moderados afetam, principalmente, o epitélio e o estroma superficial e os irritantes fortes afetam o epitélio, o estroma profundo e, por vezes, o endotélio corneano (30) (33). A medição da viabilidade do tecido RhCE, após exposição tópica a um produto químico em estudo, para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em caso de lesões oculares graves/irritação ocular (nenhuma categoria no sistema GHS da ONU e no CRE) baseia-se no pressuposto de que todos os produtos químicos indutores de lesões oculares ou irritação ocular graves induzirão citotoxicidade no epitélio da córnea e/ou na conjuntiva.

⁽²⁾ Em junho de 2013, a reunião conjunta acordou que, sempre que possível, nas *Test Guidelines* da OCDE novas e atualizadas, a expressão «produto químico em estudo» deveria passar a ser utilizada de forma mais coerente, para descrever o objeto do estudo.

21. A viabilidade dos tecidos RhCE é normalmente medida pela conversão enzimática do corante vital MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo, n.º CAS 298-93-1] pelas células viáveis do tecido num sal azul de MTT formazano, que é determinado quantitativamente depois de extraído dos tecidos (16). Os produtos químicos que não necessitam de classificação e rotulagem de acordo com o sistema GHS da ONU/CRE (nenhuma categoria) são identificados como aqueles relativamente aos quais a viabilidade dos tecidos não diminui aquém de um limiar definido (ou seja, viabilidade dos tecidos não diminui > 60 %, no caso do EITL da EpiOcular™ e do HCE EITL da SkinEthic™⁽³⁾, e > 50 %, no caso do HCE EITS da SkinEthic™⁽⁴⁾) (ver ponto 44).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA

22. Antes de utilizarem de forma rotineira os ensaios RhCE para fins normativos, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica através da previsão correta dos quinze produtos químicos para a demonstração de competência técnica que constam do quadro 1. Estes produtos químicos foram selecionados a partir dos produtos utilizados nos estudos de validação dos VRM (8) (10) (11). A seleção inclui, na medida do possível, produtos químicos que: (i) abrangem diferentes estados físicos; (ii) cobrem toda a gama de respostas *in vivo* expressas em lesões oculares graves/irritação ocular, com base em resultados de alta qualidade obtidos no ensaio ocular *in vivo* de referência no coelho (método de ensaio B.5) (2)(14), no sistema de classificação GHS da ONU (categorias 1, 2A, 2B ou nenhuma categoria) (1) e no sistema de classificação CRE (categorias 1, 2 ou nenhuma categoria); (iii) cobrem os vários fatores de classificação *in vivo* (24)(25); (iv) são representativos das classes de produtos químicos utilizadas no estudo de validação (8)(10)(11); (v) cobrem uma boa e ampla representação dos grupos funcionais orgânicos (8)(10)(11); (vi) possuem estruturas químicas bem definidas (8)(10)(11); (vii) são coloridos e/ou redutores diretos do MTT; (viii) produziram resultados reproduzíveis em métodos de ensaio RhCE durante as respetivas validações; (ix) foram corretamente preditos por métodos de ensaio RhCE durante os respetivos estudos de validação; (x) cobrem toda a gama de respostas *in vitro* baseadas em dados de alta qualidade relativos aos métodos de ensaio RhCE (viabilidade de 0 a 100 %); (xi) estão comercialmente disponíveis; e (xii) não têm custos de aquisição e/ou de eliminação proibitivos. Caso um produto químico constante da lista não esteja disponível ou não possa ser utilizado por outros motivos justificados, pode utilizar-se outro produto que satisfaça os critérios acima descritos, por exemplo, com base nos produtos químicos utilizados na validação do método de referência. Qualquer alteração deve, no entanto, ser justificada.

Quadro 1

Lista de produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica

Denominação química	N.º CAS	Grupo funcional orgânico ⁽¹⁾	Estado físico	VRM1 — (%) viabilidade ⁽²⁾	VRM2 — (%) viabilidade ⁽³⁾	Previsão do VRM	Redutor do MTT	Interf. de cor
---------------------	---------	-----------------------------------------	---------------	---------------------------------------	---------------------------------------	-----------------	----------------	----------------

Categoria *in vivo*1⁽⁴⁾

Tioglicolato de metilo	2365-48-2	Éster de ácido carboxílico; tioálcool	L	10,9 ±6,4	5,5 ±7,4	Previsão impossível	Y (forte)	N
Acrilato de hidroxitilo	818-61-1	Acrilato; Álcool	L	7,5±4,7 ⁽⁵⁾	1,6 ±1,0	Previsão impossível	N	N
2,5-Dimetil-2,5-hexanodiol	110-03-2	Álcool	S	2,3 ±0,2	0,2 ±0,1	Previsão impossível	N	N
Oxalato de sódio	62-76-0	Ácido dicarboxílico	S	29,0 ±1,2	5,3 ±4,1	Previsão impossível	N	N

Categoria *in vivo*2A⁽⁴⁾

Di-D-gluconato de N,N'-bis(4-clorofenil)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetradecano-diimidamida (20 %, aquoso) ⁽⁶⁾	18472-51-0	Halogeneto de heterocíclicos aromáticos; halogeneto de arilo; grupo di-hidroxilo; guanidina;	L	4,0 ±1,1	1,3 ±0,6	Previsão impossível	N	Y (fraco)
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------	----------------------------------------------------------------------------------------------	---	----------	----------	---------------------	---	-----------

⁽³⁾ EITL: EIT para líquidos, no caso do HCE da SkinEthic™

⁽⁴⁾ EITS: EIT para sólidos no caso do HCE da SkinEthic™

Denominação química	N.º CAS	Grupo funcional orgânico ⁽¹⁾	Estado físico	VRM1 — (%) viabilidade ⁽²⁾	VRM2 — (%) viabilidade ⁽³⁾	Previsão do VRM	Redutor do MTT	Interf. de cor
Benzoato de sódio	532-32-1	Arilo; ácido carboxílico	S	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Previsão impossível	N	N

Categoria in vivo 2B ⁽⁴⁾

Dietiltoluamida	134-62-3	Benzamida	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Previsão impossível	N	N
2,2-Dimetil-3-metilenobicyclo [2.2.1]heptano	79-92-5	Alcano ramificado com carbono terciário; alceno; bicyclo-heptano; carbociclo de anel em ponte; carbociclo cicloalcano	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Previsão impossível	N	N

Nenhuma categoria in vivo ⁽⁴⁾

Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazólio	342573-75-5	Alcóxido; sal de amónio; arilo; imidazolo; sulfato	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Nenhuma cat.	N	N
Éter dicaprílico	629-82-3	Alcóxido;éter	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Nenhuma cat.	N	N
Butóxido de piperonilo	51-03-6	Alcoxi; benzodioxole; benzilo; éter	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Nenhuma cat.	N	N
Poli(etilenoglicol (PEG-40) com óleo de rícino hidrogenado	61788-85-0	Acila; álcool; alilo; éter	Viscosidade	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Nenhuma cat.	N	N
1-(4-Clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)ureia	101-20-2	Heterocíclicos aromáticos; halogeneto de arilo; derivados de ureia	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Nenhuma cat.	N	N
2,2'-Metileno-bis[6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol]	103597-45-1	Alcano ramificado com carbono quaternário; carbocíclicos fundidos aromáticos; heterocíclicos fundidos saturados; compostos quinóides precursores; <i>terc</i> -butilo	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Nenhuma cat.	N	N

Denominação química	N.º CAS	Grupo funcional orgânico ⁽¹⁾	Estado físico	VRM1 — (%) viabilidade ⁽²⁾	VRM2 — (%) viabilidade ⁽³⁾	Previsão do VRM	Redutor do MTT	Interf. de cor
Tetrafluoroborato de potássio	14075-53-7	Sal inorgânico	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Nenhuma cat.	N	N

Abreviaturas:

N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; GHS da ONU = Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS); (1); VRM1 = Método de referência validado, IET da EpiOcular™; VRM2 = Método de referência validado, HCE IET da SkinEthic™; Interf. de cor = interferência de cor com a medição da absorvância padrão (densidade ótica – DO) do MTT formazano.

⁽¹⁾ Grupo funcional orgânico atribuído de acordo com a análise 3.3 da Toolbox da OCDE (8).

⁽²⁾ Com base nos resultados obtidos com o EIT da EpiOcular™ no ensaio de validação de irritação ocular (EIVS) do EURL ECVAM/Cosmetics Europe (8).

⁽³⁾ Com base nos resultados obtidos com o HCE EIT SkinEthic™ no estudo de validação (10) (11).

⁽⁴⁾ Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (método de ensaio B.5/TG 405 da OCDE) (2) (14) e utilizando o sistema GHS da ONU.

⁽⁵⁾ Com base nos resultados obtidos no âmbito do CEFIC CONSortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

⁽⁶⁾ A classificação na categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas categorias: se para a classificação na categoria 2A poder ser atribuída é necessário que 1 em 3 ou 2 em 3 animais exibam efeitos no sétimo dia. O estudo *in vivo* incidiu em 3 animais. Todos os animais recuperaram para a pontuação 0 ao sétimo dia, ou antes, em todos os parâmetros, exceto a opacidade da córnea num animal. No sétimo dia, este animal apresentava opacidade da córnea com pontuação 1; no nono dia, estava totalmente recuperado.

23. No âmbito do ensaio de competência técnica, recomenda-se que o utilizador verifique, após a receção dos tecidos, as propriedades de barreira dos mesmos, especificadas pelo produtor do modelo de tecido RhCE. 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 um método de ensaio esteja implantado e tenha sido adquirida e demonstrada competência técnica para o utilizar, não é necessário efetuar por rotina a referida verificação. Recomenda-se, contudo, que, ao utilizar com regularidade um método de ensaio, se continue a avaliar periodicamente as propriedades de barreira.

PROCEDIMENTO

24. Os ensaios atualmente abrangidos por este método de ensaio são os cientificamente válidos EIT da EpiOcular™ e HCE EIT da SkinEthic™ (9) (12) (13), referidos como métodos de referência validados (VRM1 e VRM2, respetivamente). Existem procedimentos operacionais normalizados (PON) para os métodos de ensaio RhCE, que devem ser utilizados nas fases de implementação e utilização dos métodos de ensaio no laboratório (34) (35). Os pontos seguintes e o apêndice 2 descrevem os principais componentes e procedimentos dos ensaios RhCE.

COMPONENTES DO MÉTODO DE ENSAIO RHCE

Condições gerais

25. Devem utilizar-se células de origem humana adequadas para reconstruir o tecido tridimensional do epitélio corneano, composto por células progressivamente estratificadas, mas não cornificadas. O modelo do tecido RhCE é preparado em inserções com uma membrana sintética porosa, através da qual os nutrientes podem passar para as células. Devem estar presentes no epitélio corneano reconstruído várias camadas de células epiteliais viáveis, não queratinizadas. O modelo de tecido RhCE deve ter a superfície epitelial em contato direto com o ar, de modo a permitir a exposição tóxica direta aos produtos químicos em estudo numa forma semelhante àquela como o epitélio corneano seria exposto *in vivo*. O modelo de tecido RhCE deve formar uma barreira funcional com robustez suficiente para resistir a uma penetração rápida de substâncias de referência citotóxicas, por exemplo, o Triton X-100 ou SDS. Importa demonstrar a eficácia da barreira, que pode ser avaliada pela determinação do tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade tecidual em 50 % (ET₅₀), por aplicação de uma substância de referência a uma concentração específica fixa – p.ex., 100 µl de Triton X-100 a 0,3 % (v/v) – ou à concentração na qual a substância de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (IC₅₀) após um tempo de exposição determinado (p.ex., 30 minutos de exposição com 50 µl de SDS) – ver ponto 30. As propriedades de contenção do tecido RhCE reconstruído devem impedir a passagem do produto químico em estudo na extremidade do tecido viável, o que redundaria numa modelação deficiente da exposição da córnea. As células de origem humana utilizadas para reconstruir o tecido RhCE devem estar isentas de contaminação por bactérias, vírus, micoplasmas e fungos. A esterilidade do tecido deve ser verificada pelo fornecedor, para assegurar que não está contaminado por fungos e bactérias.

Condições funcionais

Viabilidade

26. O ensaio utilizado para quantificar a viabilidade dos tecidos é o ensaio MTT (16). As células viáveis do tecido RhCE reconstruído reduzem o corante vital MTT a um precipitado azul de MTT formazano, que é depois extraído do tecido

com isopropanol (ou solvente similar). O MTT formazano extraído pode ser quantificado por um método normalizado de medição da absorvância (densidade ótica – DO) ou um procedimento de espectrofotometria HPLC/UPLC (36). A densidade ótica do solvente de extração isolado deve ser suficientemente baixa (< 0,1). Os utilizadores do tecido RhCE reconstruído devem garantir que cada lote utilizado preenche os critérios definidos para o controlo negativo. Os intervalos de aceitabilidade para os valores de densidade ótica dos controlos negativos para o VRMS são indicados no quadro 2. Os utilizadores de espectrofotometria HPLC/UPLC devem utilizar as gamas de controlo negativo da densidade ótica indicadas no quadro 2 como critério de aceitação para o controlo negativo. O relatório do ensaio deve documentar a estabilidade em cultura dos tecidos tratados com a substância de controlo negativo (fornecer medições da viabilidade de tecidos similares) no período de exposição do ensaio. O procedimento deve ser idêntico ao seguido pelo produtor de tecidos no âmbito do controlo de qualidade da liberação dos lotes de tecido; neste caso, podem ser aplicáveis critérios de aceitação diferentes dos especificados no quadro 2. O fabricante de tecidos RhCE deve estabelecer um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para os valores de densidade ótica dos controlos negativos (nas condições do método de ensaio do controlo da qualidade) do concetor/fornecedor.

Quadro 2

Intervalos de aceitabilidade dos valores de densidade ótica dos controlos negativos (para os utilizadores do ensaio)

Ensaio	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EIT da EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (para protocolos de líquidos e sólidos)	> 0,8 ⁽¹⁾	< 2,5
HCE EIT (HCE/S) da SkinEthic™ – VRM2 (para protocolos de líquidos e sólidos)	> 1,0	≤ 2,5

⁽¹⁾ Este limite de aceitação considera a possibilidade de períodos transporte/armazenamento prolongados (por ex., > 4 dias), que se demonstrou não ter impacto no desempenho do método de ensaio (37).

Função de barreira

27. O tecido RhCE deve ser suficientemente espesso e robusto para resistir à rápida penetração de substâncias de referência citotóxicas, estimada, por exemplo, pelo EF₅₀ (Triton X-100) ou pela IC₅₀ (SDS) (quadro 3). A função de barreira de cada lote do tecido RhCE utilizado deve ser demonstrada pelo concetor/fornecedor do RhCE, aquando do fornecimento dos tecidos ao utilizador final (ver ponto 30).

Morfologia

28. O exame histológico do tecido RhCE deve mostrar uma estrutura de epitélio corneano humano (incluindo pelo menos 3 camadas de células epiteliais viáveis e uma superfície não queratinizada). Para os VRM, a morfologia adequada foi estabelecida pelo criador/fornecedor, pelo que não precisa de ser novamente demonstrada por um utilizador do método de ensaio para cada lote de tecidos utilizado.

Reprodutibilidade

29. Os resultados dos controlos positivos e negativos do método de ensaio devem mostrar reprodutibilidade ao longo do tempo.

Controlo de qualidade

30. O tecido RhCE só deve ser utilizado se o concetor/fornecedor demonstrar que cada lote obedece a critérios definidos de liberação da produção, dos quais o de viabilidade (ponto 26) e o de função de barreira (ver ponto 27) são os mais relevantes. O concetor/fornecedor do tecido RhCE deve estabelecer uma gama de aceitabilidade (limites superior e inferior) para as funções de barreira, medidas por ET₅₀ ou IC₅₀ (ver pontos 25 e 26). A gama de aceitabilidade do ET₅₀ e IC₅₀, utilizada como critério de controlo da qualidade para a liberação dos lotes de RhCE pelo seu concetor/fornecedor (utilizado nos VRM), figura no quadro 3. O concetor/fornecedor do tecido RhCE deve fornecer aos utilizadores do método de ensaio dados que demonstrem o cumprimento de todos os critérios de liberação da produção, para que os utilizadores possam incluir essas informações no relatório de ensaio. Apenas os resultados obtidos com tecidos que satisfaçam todos os critérios de liberação da produção podem ser aceites para a previsão fiável de produtos químicos que, em conformidade com o GHS da ONU/CRE, não necessitem de classificação e rotulagem em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves.

Quadro 3

Critério de QC para a liberação de lotes

Ensaio	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EIT da EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 [100 µl de Triton X-100 a 0,3 % (v/v)]	ET ₅₀ = 12,2 min	ET ₅₀ = 37,5 min
HCE IET (HCE/S) da SkinEthic™ – VRM2 (tratamento de 30 minutos, com 50 µl de SDS)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

31. Em cada ensaio de cada série, devem utilizar-se, pelo menos, dois replicados de tecido para cada produto químico em estudo e para cada substância de controlo. Utilizam-se dois protocolos de tratamento diferentes, um para produtos químicos em estudo no estado líquido e outro para produtos químicos no estado sólido (34) (35). Para ambos os métodos e protocolos, a superfície do modelo de tecido deve ser humedecida com solução salina tamponada de fosfatos de Dulbecco, sem cálcio e sem magnésio (DPBS sem Ca²⁺/Mg²⁺), antes da aplicação dos produtos químicos em estudo, para simular as condições de humidade do olho humano. O tratamento dos tecidos é iniciado com a exposição ao(s) produto(s) químico(s) em estudo e às substâncias de controlo. Para ambos os protocolos de tratamento de ambos os VRM, aplica-se uma quantidade suficiente do produto químico em estudo ou da substância de controlo para cobrir uniformemente a superfície epitelial, evitando-se uma dose infinita (ver pontos 32 e 33) (apêndice 2).
32. Os produtos químicos em estudo que possam ser pipetados a 37 °C ou a temperaturas inferiores – utilizando uma pipeta de deslocamento positivo, se necessário – são tratados como líquidos nos VRM; caso contrário, devem ser tratados como sólidos (ver ponto 33). Nos VRM, o produto químico líquido em estudo está uniformemente espalhado pela superfície do tecido – ou seja, um mínimo de 60 µl/cm de aplicação; ver apêndice 2, (33) (34). Devem evitar-se, na medida do possível, efeitos capilares (efeitos de tensão superficial) que possam ocorrer devido aos baixos volumes aplicados na inserção (na superfície do tecido), para garantir a dosagem correta do tecido. Os tecidos tratados com produtos químicos líquidos em estudo são incubados durante 30 minutos em condições de cultura normais (37±2 °C, 5±1 % CO₂, ≥ 95 % HR). No final do período de exposição, devem remover-se cuidadosamente da superfície do tecido o produto químico líquido em estudo e as substâncias de controlo, através de uma lavagem extensiva com DPBS sem Ca²⁺/Mg²⁺, à temperatura ambiente. Esta fase de lavagem é seguida por uma imersão pós-exposição em meio fresco à temperatura ambiente – para retirar o produto químico em estudo absorvido pelo tecido – por um período predefinido, que varia em função do VRM utilizado. Unicamente para o VRM1, antes da realização do ensaio com MTT, é praticada uma incubação pós-exposição em meio fresco, em condições de cultura normais – ver apêndice 2, (34) (35).
33. Os produtos químicos em estudo que não possam ser pipetados a temperaturas até 37 °C são tratados como sólidos no VRM. A quantidade de produto aplicada deve ser suficiente para cobrir toda a superfície do tecido, ou seja, deve utilizar-se um mínimo de 60 mg/cm² (apêndice 2). Sempre que possível, os sólidos devem ser ensaiados na forma de pó fino. Os tecidos tratados com produtos químicos sólidos são incubados por um período predefinido, consoante o VRM utilizado, em condições de cultura normais – ver apêndice 2, (34) (35). No final do período de exposição, devem remover-se cuidadosamente da superfície do tecido o produto químico em estudo e as substâncias de controlo, através de uma lavagem extensiva com DPBS sem Ca²⁺/Mg²⁺, à temperatura ambiente. Esta fase de lavagem é seguida de uma imersão pós-exposição em meio fresco, à temperatura ambiente – para remoção do produto químico em estudo absorvido pelo tecido –, por um período predefinido que varia em função do VRM utilizado, e de uma incubação após exposição em meio fresco em condições de cultura normais, antes da realização do ensaio com MTT – ver apêndice 2, (34) (35).

34. Devem prever-se controlos negativos e positivos paralelos, para demonstrar que a viabilidade (determinada com o controlo negativo) e a sensibilidade (determinada com o controlo positivo) dos tecidos se encontram dentro dos intervalos de aceitação definidos com base em dados históricos. O controlo negativo paralelo proporciona ainda a linha de base (100 % de viabilidade dos tecidos) para calcular a percentagem de viabilidade relativa dos tecidos tratados com o produto químico em estudo (ensaio de % de viabilidade). A substância de controlo positivo recomendada para o VRM é o acetato de metilo puro (n.º CAS 79-20-9, comercializado, por exemplo, pela Sigma-Aldrich, Cat n.º 45997; líquido). As substâncias de controlo negativo recomendadas para os VRM1 e VRM2 são água ultrapura e DPBS sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, respetivamente. Foram estas as substâncias de controlo utilizadas nos estudos de validação dos VRM e aquelas para as quais existem mais dados. A utilização de outras substâncias de controlo, positivas ou negativas, adequadas deverá justificar-se científica e adequadamente. Os controlos negativos e positivos devem ser ensaiados com o(s) protocolo(s) utilizado(s) para os produtos químicos em estudo incluídos na série de ensaios (líquidos e/ou sólidos). A aplicação deve ser seguida da exposição ao produto químico em estudo, da lavagem, da imersão pós-exposição e da incubação pós-exposição, quando pertinente, conforme descrito para os controlos paralelos aos ensaios dos produtos químicos líquidos (ver ponto 32) ou para os controlos paralelos aos ensaios dos produtos químicos sólidos (ver ponto 33), antes da realização do ensaio com MTT (ver ponto 35) (34) (35). Um único conjunto de controlos negativos e positivos é suficiente para todos os produtos químicos no mesmo estado físico (líquidos ou sólidos) incluídos na mesma série de ensaios.

Medições de viabilidade dos tecidos

35. 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. O ensaio do MTT é efetuado imediatamente após o período de incubação pós-exposição. Nos VRM, a amostra de tecido RhCE é colocada em 0,3 ml de solução de MTT a 1 mg/ml durante 180 ± 15 minutos, em condições de cultura normais. O corante vital MTT é reduzido a um precipitado azul de MTT formazano pelas células viáveis do tecido RhCE. O precipitado é em seguida extraído do tecido com recurso a um volume adequado de isopropanol, ou a um solvente similar (34) (35). No caso dos tecidos ensaiados com produtos químicos líquidos em estudo, a extração deve ser feita da parte superior e inferior, enquanto no caso dos tecidos ensaiados com produtos químicos sólidos e líquidos coloridos, a extração deve ser efetuada unicamente da parte inferior, para minimizar uma eventual contaminação da solução de extração de isopropanol com produto químico em estudo que possa ter permanecido no tecido. No caso dos tecidos que tenham sido ensaiados com produtos químicos líquidos e que não tenham sido imediatamente lavados, a extração também deve ser feita apenas da parte inferior. As substâncias de controlo positivo e positivo paralelo devem ser tratadas de forma similar à do produto químico em estudo. O MTT formazano extraído pode ser quantificado quer por medição da absorvância-padrão (DO) a 570 nm, utilizando um filtro de banda passante de ± 30 nm, no máximo, quer por um procedimento de espectrofotometria HPLC/UPLC –ver ponto 42 (11) (36).
36. As propriedades óticas do produto químico em estudo ou a sua ação química sobre o MTT podem interferir na medição do MTT formazano, conduzindo a uma estimativa falsa da viabilidade dos tecidos. Os produtos químicos em estudo podem interferir com a medição do MTT formazano por redução direta do MTT a azul de MTT formazano e/ou por interferência cromática, se a sua absorvância, quer natural, quer devida a procedimentos de tratamento, se situar na mesma gama de densidade ótica que o MTT formazano (cerca de 570 nm). Devem realizar-se controlos prévios para permitir a identificação de potenciais redutores diretos do MTT e/ou de produtos químicos com interferência cromática; devem ainda efetuar-se controlos adicionais para detetar e corrigir possíveis interferências desses produtos químicos em estudo (ver os pontos 37 a 41). Este aspeto é especialmente importante quando um produto químico em estudo não é completamente removido do tecido RhCE por lavagem ou quando penetra no epitélio corneano propriamente dito e está, portanto, presente no tecido RhCE quando é realizado o ensaio do MTT. No caso dos produtos químicos que absorvem a luz na mesma gama do MTT formazano (naturalmente ou após tratamento) e que não são compatíveis com a medição da absorvância-padrão (DO) do MTT formazano devido a uma interferência demasiado forte – ou seja, uma forte absorvância a 570 ± 30 nm –, pode recorrer-se a um procedimento de espectrofotometria-HPLC/UPLC para medir o MTT formazano (ver pontos 41 e 42) (11) (36). Nos PON dos VRM está disponível uma descrição pormenorizada do modo de deteção e correção da redução direta do MTT e das interferências dos agentes corantes (34) (35). Os apêndices III e IV contêm fluxogramas com orientações sobre o modo de identificar e manusear os redutores diretos do MTT e/ou os produtos químicos suscetíveis de interferirem cromaticamente no VRM1 e VRM2, respetivamente.

37. Para identificar eventuais interferências provocadas por produtos químicos em estudo com a mesma gama de absorvância da luz que o MTT (naturalmente ou após tratamento) e determinar a necessidade de proceder a controlos adicionais, o produto químico em estudo é adicionado a água e/ou isopropanol e incubado, por um período adequado, à temperatura ambiente – ver apêndice 2, (34) (35). Se o produto químico em estudo, dissolvido em água e/ou em isopropanol, mostrar uma absorvância suficiente na gama de 570 ± 20 nm para o VRM1 (ver apêndice 3), ou caso se obtenha uma solução colorida quando se mistura o produto com água, para o VRM2 (ver apêndice 4), presume-se que o produto químico em causa interfere com a medição da absorvância-padrão do MTT formazano, devendo realizar-se controlos de corante complementares ou, em alternativa, utilizar um procedimento de espectrofotometria HPLC/UPLC, caso em que estes controlos não são exigidos (ver pontos 41 e 42 e apêndices III e IV) (34) (35). Ao efetuar a medição da absorvância-padrão, deve-se aplicar cada um dos produtos químicos em estudo interferentes em, pelo menos, dois replicados viáveis do tecido, que são submetidos à totalidade do processo de ensaio, mas são incubados em meio e não na solução de MTT durante a fase de incubação com MTT, de modo a produzir uma cor não específica no controlo dos tecidos vivos (NSC_{vivos}) (34) (35). O controlo NSC_{vivos} tem de ser realizado em paralelo ao ensaio do produto químico corado em estudo; no caso de ensaios múltiplos, é necessário efetuar, em cada série de ensaios, um NSC_{vivos} independente para cada ensaio, devido à variabilidade biológica intrínseca dos tecidos vivos. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo interferente e incubados com a solução de MTT (ensaio de % de viabilidade) menos a percentagem de cor não específica obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo interferente e incubados em meio sem MTT paralelamente à correção do ensaio (% NSC_{vivos}), ou seja: viabilidade real do tecido = [ensaio de % de viabilidade] - [% NSC_{vivos}].
38. Para identificar os redutores diretos do MTT, os produtos químicos de ensaio devem ser adicionados a soluções de MTT recentemente preparadas. Adiciona-se uma quantidade adequada do produto químico em estudo a uma solução de MTT, sendo a mistura incubada durante cerca de 3 horas em condições de cultura normais (ver apêndices III e IV) (34) (35). Se a mistura de MTT que contém o produto químico em estudo (ou a suspensão, no caso de produtos químicos insolúveis) se tornar azul/púrpura, considera-se que o produto reduz diretamente o MTT, devendo proceder-se a um controlo funcional complementar nos tecidos RhCE não viáveis, independentemente de se recorrer à medição da absorvância padrão ou a um procedimento de espectrofotometria HPLC/UPLC. Este controlo funcional complementar utiliza tecidos mortos, que apenas possuem atividade metabólica residual, mas absorvem e retêm o produto químico em estudo de forma semelhante aos tecidos viáveis. Os tecidos do VRM1 mortos «por congelamento» são preparados por exposição a baixas temperaturas. Os tecidos do VRM2 mortos «em água» são preparados por incubação prolongada (pelo menos, 24 ± 1 h) em água, seguida de armazenagem a baixa temperatura. Cada produto químico em estudo redutor do MTT é aplicado em, pelo menos, dois tecidos replicados mortos, que são submetidos a todo o processo de ensaio a fim de gerarem um controlo não específico da redução do MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Basta um único controlo do NSMTT para cada produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou de ensaios/séries de ensaios realizados. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade do tecido obtida com os tecidos vivos expostos ao redutor do MTT (ensaio de % de viabilidade), menos a percentagem de redução não específica do MTT obtida com os tecidos mortos expostos ao mesmo redutor do MTT, calculada em relação ao controlo negativo concomitante ao ensaio a corrigir, ou seja: viabilidade real do tecido = [ensaio de % de viabilidade] - [(% NSMTT)].
39. Os produtos químicos em estudo identificados como produzindo tanto interferências cromáticas (ver ponto 37) como uma redução direta do MTT (ver ponto 38) deverão também ser objeto de um terceiro conjunto de controlos no âmbito da medição da absorvância-padrão (DO), para além dos controlos de NSMTT e NSC_{vivos} a que se referem os números anteriores. Trata-se, em geral, de produtos químicos de cor escura que absorvem luz na gama 570 ± 30 nm (por exemplo, azuis, púrpura, pretos), porque a sua cor intrínseca impede a avaliação da capacidade de reduzirem diretamente o MTT, conforme descrito no ponto 38. Esta situação força o recurso, por defeito, a controlos de NSMTT em conjunto com os controlos NSC_{vivos}. Os produtos químicos em estudo para os quais se realizem ambos os controlos NSMTT e NSC_{vivos} podem ser absorvidos e retidos por tecidos vivos e mortos. Por conseguinte, neste caso, o controlo NSMTT permite não só corrigir uma potencial redução direta do MTT pelo produto químico em estudo, como também evitar as interferências cromáticas resultantes da absorção e da retenção do produto pelos tecidos mortos. Pode, assim observar-se a uma dupla correção das interferências cromáticas, uma vez que o controlo NSC_{vivos} corrige já as interferências que resultam da absorção e retenção do produto químico em estudo pelos tecidos vivos. Para evitar uma eventual dupla correção da interferência cromática, importa realizar um

terceiro controlo cromático não específico nos tecidos mortos (NSC_{mortos}) – ver apêndices III e IV (34) (35). Neste controlo adicional, aplica-se o produto químico em estudo em, pelo menos, dois replicados dos tecidos mortos, que são submetidos à totalidade do procedimento de ensaio mas são incubados com meio durante a etapa de incubação com MTT, em vez da solução de MTT. Basta um único controlo NSC_{mortos} por produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou séries de ensaios, mas deve ser realizado concomitantemente com o controlo NSMTT e com o mesmo lote de tecidos. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico (ensaio de % de viabilidade) menos %NSMTT menos % NSC_{vivos} mais a percentagem de cor não específica obtida com tecidos mortos expostos ao produto químico em estudo interferente e incubados em meio sem MTT, calculada em relação à amostra do controlo negativo realizado em simultâneo com o ensaio a corrigir (% NSC_{mortos}), ou seja: viabilidade real do tecido = [ensaio de % de viabilidade] - [%NSMTT] - [% NSC_{vivos}] + [% NSC_{mortos}].

40. É importante assinalar que a redução não específica do MTT e as interferências cromáticas não específicas podem aumentar a densidade ótica (nas medições da absorvância-padrão) do extrato de tecido acima da gama de linearidade do espectrofotómetro e que, na medição por espectrofotometria HPLC/UPLC, a redução não específica do MTT pode também aumentar a área do pico de formazano do extrato de tecido acima da gama de linearidade do espectrofotómetro. Neste contexto, cada laboratório deve determinar a densidade ótica/área de pico da gama de linearidade do respetivo espectrofotómetro, por exemplo, com MTT formazano (n.º CAS 57360-69-7), comercializado, por exemplo, pela Sigma-Aldrich (n.º Cat M2003), antes de iniciar o ensaio de produtos químicos em estudo para fins normativos.
41. A medição da absorvância-padrão (DO) com espectrofotómetro é adequada para avaliar produtos químicos em estudo redutores diretos do MTT e com interferência cromática, se a interferência observada com a medição do MTT formazano não for muito forte (ou seja, se as DO dos extratos de tecidos obtidos com o produto químico em estudo, sem qualquer correção para a redução direta do MTT e/ou para a interferência cromática, se situarem na gama linear do espectrofotómetro). No entanto, os resultados para produtos químicos em estudo que produzam % NSMTT e/ou % NSC_{vivos} iguais ou superiores a 60 % (VRM1 e protocolo de líquidos do VRM2) ou 50 % (protocolo de sólidos do VRM2) do controlo negativo devem ser interpretados com precaução, dado tratar-se do valor-limite estabelecido no VRMS para distinguir os produtos químicos classificados dos não classificados (ver ponto 44). Contudo, não é possível medir a absorvância-padrão (DO) se a interferência com a medição de MTT formazano for muito intensa (ou seja, de forma a que as DO não corrigidas dos extratos de tecidos se situem fora do intervalo linear do espectrofotómetro). Os produtos químicos em estudo corados ou que adquiram coloração em contacto com a água ou com o isopropanol e que interfiram muito fortemente com a medição da absorvância-padrão (DO) do MTT formazano podem também ser avaliados por recurso à espectrofotometria HPLC/UPLC (ver apêndices III e IV), pelo facto de o sistema HPLC/UPLC permitir a separação do MTT formazano do produto químico antes da sua quantificação (36). Por este motivo, nunca são necessários controlos NCS_{vivos} ou NCS_{mortos} quando se utiliza este método, independentemente do produto químico em estudo. Contudo, devem realizar-se controlos NSMTT se se suspeitar que o produto em causa reduz diretamente o MTT (cf. procedimento descrito no ponto 38). Devem também realizar-se estes controlos no caso de produtos químicos com uma coloração (intrínseca ou aparente quando dissolvidos em água) que impeça a avaliação da sua capacidade de reduzirem diretamente o MTT, conforme descrito no ponto 38. Caso se recorra à espectrofotometria HPLC/UPLC para medir o MTT formazano, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como a percentagem de todos os picos do MTT formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido em paralelo com o controlo negativo. No caso de produtos químicos suscetíveis de reduzirem diretamente o MTT, a viabilidade real dos tecidos é calculada do seguinte modo: ensaio da % de viabilidade menos % NSMTT, tal como descrito no último período do ponto 38. Por último, importa referir que os redutores diretos do MTT, nomeadamente os que são também interferentes cromáticos e que são retidos nos tecidos após o tratamento e reduzem tão fortemente o MTT que produzem DO (pelo método de medição da densidade ótica padrão) ou áreas de picos (por espectrofotometria UPLC/HPLC) não abrangidas pela gama de linearidade do espectrofotómetro, não permitem que os extratos de tecidos sejam avaliados pelos métodos do ensaio RhCE, embora se preveja que tal ocorra apenas em casos muito raros.

42. A espectrofotometria HPLC/UPLC pode ser utilizada para a medição do MTT formazano com todos os tipos de produtos químicos em estudo (corados ou não, redutores de MTT ou não) (36). Atendendo à diversidade dos sistemas de espectrofotometria HPLC/UPLC, não é exequível que cada utilizador adote exatamente as mesmas condições sistémicas. Pelo mesmo motivo, a qualificação dos sistemas de espectrofotometria HPLC/UPLC deve ser demonstrada antes de serem utilizados para quantificar o MTT formazano de extratos de tecidos, através do cumprimento dos critérios de aceitação de um conjunto de parâmetros de qualificação normalizados conformes com os descritos na *U.S. Food and Drug Administration guidance for industry on bio-analytical method validation*. Estes parâmetros-chave e os respetivos critérios de aceitação constam do apêndice 5. Se os critérios de aceitação definidos no apêndice 5 forem cumpridos, considera-se o sistema de espectrofotometria HPLC/UPLC qualificado para determinar o MTT formazano nas condições experimentais descritas no presente método de ensaio.

Crítérios de aceitação

43. Para cada série de ensaios que utilize lotes de tecidos RhCE conformes com o controlo de qualidade (ver ponto 30), os tecidos tratados com a substância de controlo negativa devem apresentar uma densidade ótica que reflita a qualidade dos tecidos subsequente à expedição, à receção e a todos os processos do protocolo, não devendo situar-se fora dos limites históricos descritos no quadro 2 (ver ponto 26). Da mesma forma, os tecidos tratados com a substância de controlo positivo (acetato de metilo) devem apresentar uma viabilidade tecidual média < 50 %, em relação ao controlo negativo no VRM1, no caso dos protocolos para líquidos ou sólidos, e ≤ 30 % (protocolo para líquidos) ou ≤ 20 % (protocolo para sólidos), em relação ao controlo negativo do VRM2, refletindo a sua capacidade de reação a um produto químico irritante, nas condições do método de ensaio (34)(35). A variabilidade entre os tecidos replicados dos produtos químicos em estudo e/ou dos produtos químicos de controlo deve situar-se dentro dos limites aceites (a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 20 % ou o desvio-padrão entre os três tecidos replicados não deve ser superior a 18 %). Se o controlo negativo ou positivo de uma série de ensaios se situar fora das gamas aceites, considera-se a série «não qualificada», pelo que deve ser repetida. Se a variabilidade entre os tecidos replicados do produto químico em estudo se situar fora da gama aceite, o ensaio é considerado «não qualificado», devendo o produto químico em estudo ser submetido a novo ensaio.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

44. Os valores da densidade ótica/das áreas dos picos obtidos com extratos de tecidos replicados, para cada produto químico em estudo, são utilizados para calcular a percentagem média de viabilidade dos tecidos (média entre os replicados dos tecidos) normalizada para o controlo negativo, fixada em 100 %. O valor-limite da percentagem de viabilidade dos tecidos para identificar produtos químicos em estudo que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves (nenhuma categoria no sistema GHS da ONU e na categoria CRE) consta do quadro 4. Os resultados devem ser interpretados do seguinte modo:

- Considera-se que o produto químico em estudo não necessita de classificação e rotulagem em conformidade com o sistema GHS da ONU e com o CRE (nenhuma categoria) se a percentagem média de viabilidade dos tecidos após exposição e incubação pós-exposição for superior ao valor-limite percentual estabelecido para a viabilidade dos tecidos, indicado no quadro 4. Neste caso, não são necessários ensaios complementares por outros métodos de ensaio.
- Se a percentagem média de viabilidade dos tecidos após a exposição e a incubação pós-exposição for inferior ou igual ao valor-limite estabelecido para a percentagem de viabilidade dos tecidos, não é possível efetuar qualquer previsão, como se pode comprovar no quadro 4. Neste caso, serão necessários ensaios complementares por outros métodos de ensaio, dado que os métodos RhCE apresentam um certo número de resultados falsos positivos (ver pontos 14 a 15) e não permitem distinguir entre as categorias 1 e 2 do sistema GHS da ONU e do CRE (ver ponto 17).

Quadro 4

Modelos de previsão de acordo com a classificação GHS da ONU e da CRE

VRM	Nenhuma categoria	Previsão impossível
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (para ambos os protocolos)	Viabilidade média dos tecidos > 60 %	Viabilidade média dos tecidos ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (para protocolos de líquidos)	Viabilidade média dos tecidos > 60 %	Viabilidade média dos tecidos ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (para protocolos de sólidos)	Viabilidade média dos tecidos > 50 %	Viabilidade média dos tecidos ≤ 50 %

45. Se a classificação do produto químico em estudo for inequívoca, basta normalmente um ensaio constituído por, pelo menos, dos replicados de tecidos. Porém, nos casos inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados e/ou percentagem média de viabilidade do tecido igual a 60 ± 5 % (VRM1 e VRM2, no caso do protocolo para líquidos) ou 50 ± 5 % (VRM2, no caso do protocolo para sólidos), é de ponderar a realização de um segundo ensaio, bem como de um terceiro se os resultados dos dois primeiros forem discordantes.
46. Para aumentar o desempenho global do método de ensaio para certos tipos de misturas, podem ponderar-se, quando adequado e justificável, valores-limite diferentes, no que respeita à percentagem de viabilidade dos tecidos, para distinguir produtos químicos em estudo classificados e não classificados (ver ponto 14). Os produtos químicos de referência podem ser úteis para avaliar o potencial de lesões oculares graves/irritação ocular dos produtos químicos em estudo ou de produtos desconhecidos de determinadas classes, bem como para avaliar o potencial de toxicidade ocular relativa de um produto químico classificado numa gama específica de respostas positivas.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

47. Para cada produto químico em estudo, devem apresentar-se num quadro os dados relativos aos tecidos individuais replicados numa série de ensaios (por exemplo, valores de DO/áreas de pico do MTT formazano e dados relativos à percentagem calculada de viabilidade dos tecidos e a previsão final do método de ensaio RhCE), incluindo os dados dos ensaios repetidos, se pertinente. Além disso, deve comunicar-se a percentagem média de viabilidade dos tecidos e a diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados (se $n = 2$ tecidos replicados) ou o DP (se $n \geq 3$ tecidos replicados), para cada produto químico em estudo e para cada amostra de controlo. Devem também comunicar-se as eventuais interferências do produto químico em estudo com a medição do MTT formazano, expressas na redução direta do MTT e/ou em interferências cromáticas.

Relatório de ensaio

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

Produto químico em estudo

Substância monocomponente:

- Identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) de registo CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Estado físico, volatilidade, pH, log(P), peso molecular, classe química e outras propriedades físico-químicas pertinentes para a realização do estudo, na medida em que estejam disponíveis;

- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver supra), pureza, ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas (ver supra) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;
- Estado físico e outras propriedades físico-químicas pertinentes para a realização do estudo, na medida em que estejam disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Substâncias de controlo positivas e negativas

- Identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) de registo CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Estado físico, volatilidade, peso molecular, classe química e outras propriedades físico-químicas pertinentes para a realização do estudo, na medida em que estejam disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Se for caso disso, justificação do recurso a um controlo negativo diferente da água ultrapura ou do DPBS sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$;
- Se for caso disso, justificação do recurso a um controlo positivo diferente do acetato de metilo puro;
- Referência a resultados históricos de controlo positivo e negativo que demonstrem critérios de aceitação válidos.

Informações relativas ao patrocinador e ao laboratório

- Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo.
- Modelo de tecido RhCE e protocolo utilizados (e fundamentação das escolhas, se for caso disso)

Condições do método de ensaio

- O modelo de tecido RhCE utilizado, incluindo o número do lote;
- Comprimento de onda e gama de comprimentos de onda (se pertinente) para quantificar o MTT formazano e gama de linearidade do dispositivo de medição (espectrofotómetro, por exemplo).
- Descrição do método utilizado para quantificar o MTT formazano;
- Descrição do sistema de sistema de espectrofotometria HPLC/UPLC utilizado, se pertinente;
- Informações completas que substanciem o modelo de tecido RhCE utilizado, incluindo dados sobre o respetivo desempenho. Devem incluir, nomeadamente, o seguinte:
 - i) Controlo de qualidade da viabilidade (fornecedor)
 - ii) Viabilidade nas condições do método de ensaio (utilizador);
 - iii) Controlo da qualidade da função de barreira;
 - iv) Morfologia, se conhecida;
 - v) Capacidade de reprodutibilidade e de previsão;
 - vi) Outros controlos de qualidade (QC) do modelo de tecidos RhCE, se pertinente;
- Referência a dados históricos sobre o modelo do tecido RhCE. Deve incluir, nomeadamente, a aceitabilidade dos dados de controlo de qualidade em relação aos dados históricos dos lotes,
- Declaração de que o laboratório de ensaio demonstrou competência técnica para a aplicação do método de ensaio antes da sua utilização regular, tendo procedido ao ensaio dos produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica;

Crítérios de aceitação de séries de ensaios e de ensaios

- Meios de controlo positivo e negativo e gamas de aceitação baseadas em dados históricos;
- Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados, para os controlos positivos e negativos;
- Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados, para o produto químico em estudo;

Procedimento de ensaio

- Elementos sobre o procedimento de ensaio adotado;
- Doses do produto químico em estudo e das substâncias de controlo utilizadas;
- Duração e temperatura da exposição, da imersão pós-exposição e dos períodos de incubação pós-exposição (se pertinente);
- Descrição de eventuais modificações do protocolo do ensaio;

- Indicação dos controlos utilizados nos redutores diretos do MTT e/ou dos produtos químicos em estudo que apresentem coloração, se pertinente;
- Número de replicados de tecidos utilizados por cada produto químico em estudo e de controlo (NSMTT, NSC_{vivos} e NSC_{mortos}, se pertinente);

Resultados

- Quadro com os dados relativos a todos os produtos químicos e substâncias de controlo de cada série de ensaios (incluindo ensaios repetidos, se pertinente), a todas as medições de replicados – incluindo a densidade ótica (DO) ou a área de pico do MTT formazano –, percentagem de viabilidade dos tecidos, percentagem média de viabilidade dos tecidos, diferenças entre os tecidos replicados, ou DP, e predição final;
- Se for caso disso, os resultados dos controlos utilizados para os redutores diretos do MTT e/ou para os produtos químicos em estudo corados, incluindo o valor da DO ou a área do pico do MTT formazano, % NSMTT, % NSC_{vivos}, % NSC_{mortos}, diferença entre os tecidos replicados ou DP, percentagem final correta de viabilidade dos tecidos e previsão final;
- Resultados obtidos com o(s) produto(s) químico(s) em estudo e as substâncias de controlo no que diz respeito ao(s) critério(s) de definição e de aceitação do ensaio;
- Descrição de quaisquer outros efeitos observados, por exemplo, coloração dos tecidos por um produto químico corado;

Discussão dos resultados

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ONU (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Capítulo B.5 do presente anexo, «Irritação/corrosão ocular agudas».
- (3) Capítulo B.47 do presente anexo, «Método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves».
- (4) Capítulo B.48 do presente anexo, «Método de ensaio em olhos de frango isolados para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves».
- (5) Capítulo B.61 do presente anexo, «Método de ensaio de difusão de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos».
- (6) Capítulo B.68 do presente anexo, «Método de ensaio de exposição *in vitro* de curta duração para identificação i) de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e ii) de produtos químicos que não necessitam de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves».
- (7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

- (8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.
- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscrito em preparação).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (17) OCDE (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (18) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.
- (23) Kollé, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.
- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749-815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665-697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol.* 39, 2610-2625.
- (33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.
- (34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponível em: [<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].
- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponível em: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Abordagem ascendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se pense não necessitarem de ser classificados e rotulados em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que não careçam de classificação e rotulagem (resultado negativo) a partir de outros produtos químicos (resultado positivo).

Abordagem descendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se suspeite causarem lesões oculares graves; inicia-se com a determinação dos produtos químicos que induzam lesões oculares graves (resultado positivo) a partir de outros produtos químicos (resultado negativo).

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 estudo. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (18).

Amostra de controlo negativo: Amostra que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e é tratada com uma substância conhecida por induzir uma reação positiva no sistema de ensaio. Esta amostra é preparada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, sendo utilizada para determinar a viabilidade dos tecidos a 100 %.

Amostra de controlo positivo: Amostra que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e é tratada com uma substância conhecida por induzir uma reação positiva no sistema de ensaio. Esta amostra tratada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

Categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «lesões oculares graves».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «irritação ocular».

Concordância: Ver «exatidão».

Córnea: Parte anterior transparente do globo ocular que recobre a íris e a pupila e deixa passar a luz para o interior.

CV: Coeficiente de variação.

Dev: Desvio.

DO: Densidade ótica.

DP: Desvio-padrão.

Dose infinita: Quantidade de produto químico em estudo aplicada no tecido RhCE que excede a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície epitelial.

Efeitos oculares irreversíveis: Ver «lesões oculares graves».

Efeitos oculares reversíveis: Ver «irritação ocular».

EIT: Ensaio de irritação ocular.

Ensaio: Um único produto químico em estudo ensaiado em paralelo com, pelo menos, dois tecidos replicados, como definido no PON correspondente.

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 (18).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos em estudo negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados são estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método (18).

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia de ensaios por etapas que usa métodos de ensaio de forma sequencial. As informações disponíveis sobre o produto químico em estudo são avaliadas a cada etapa, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova, com o objetivo de determinar se são suficientes para a classificação de perigosidade, antes de passar à etapa seguinte. Se as informações existentes possibilitarem a atribuição de um potencial de perigosidade ao produto químico em estudo numa dada etapa, não serão necessários mais ensaios (18).

EURL ECVAM: Laboratório de referência da União Europeia para as alternativas à experimentação animal.

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência 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 do método de ensaio (18).

ET₅₀: Tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade do tecido em 50 % após aplicação de uma concentração específica e fixa de um produto químico de referência.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial (18).

Irritação ocular: Alterações oculares decorrentes da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Esta expressão, bem como as expressões «efeitos oculares reversíveis» ou «categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE», são utilizadas indistintamente.

Lesões oculares graves: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão decorrente da aplicação de um produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação. Esta expressão, bem como as expressões «efeitos oculares irreversíveis» ou «categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE», são utilizadas indistintamente.

LLOQ: Limite de quantificação inferior.

Log(P): Logaritmo do coeficiente de repartição octanol/água.

Método de ensaio válido: Método de ensaio cuja importância e cuja fiabilidade são consideradas suficientes para um objetivo específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um método de ensaio nunca é válido em sentido absoluto, mas apenas em relação a um determinado objetivo (18).

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 a sua fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (18).

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]; brometo de tiazolilo; azul de tetrazólio.

Não classificado: Produtos químicos não classificados em termos de irritação ocular (categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE, categorias 2A ou 2B do sistema GHS da ONU) ou de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE). Designação utilizada indistintamente com a classificação «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU/CRE.

«Nenhuma categoria» do sistema GHS da ONU/CRE: Produtos químicos que não satisfaçam os requisitos para classificação nas categorias 1 ou 2 do sistema GHS da ONU/CRE (ou na categoria 2A ou 2B do sistema GHS da ONU). Esta expressão e a expressão «não classificado» são utilizadas indistintamente.

Normas de desempenho: Normas baseadas um método de referência validado que tenha sido considerado cientificamente válido e que constituem a base para a avaliação da comparabilidade de um método de ensaio proposto mecanística e funcionalmente similar. Incluem-se: i) componentes essenciais do método de ensaio; ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; iii) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (18).

NSMTT: Redução não específica do MTT.

NSC_{mortos}: Cor não específica em tecidos mortos.

NSC_{vivos}: Cor não específica em tecidos vivos.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos num organismo, sistema, população ou subpopulação exposto ao agente em causa.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e fracos dos vários elementos de informação para tirar conclusões fundamentadas sobre o potencial de perigosidade do produto químico em estudo.

Procedimentos operacionais normalizados (PON): Procedimentos formais e escritos que descrevem em pormenor o modo como devem ser realizadas as operações laboratoriais de rotina e as específicas do ensaio. São previstos pelo CRE.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico de referência: Produto químico utilizado como padrão de comparação com o produto químico em estudo. Um produto químico de referência deve ter as seguintes propriedades: (i) origem ou origens uniformes e fiáveis para a sua identificação e caracterização; (ii) similaridade estrutural, funcional e/ou química com a classe de produtos químicos em estudo; (iii) características físico-químicas conhecidas; (iv) existência de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) representatividade conhecida, situada na gama de reação pretendida.

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

Reprodutibilidade: Acordo entre resultados obtidos em ensaios com o mesmo produto químico, utilizando o mesmo protocolo de ensaio (ver «fiabilidade») (18).

RhCE: Epitélio corneano humano reconstruído.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos em estudo positivos/ativos que são corretamente classificados 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 (18).

Série de ensaios: Uma série de ensaios consiste no ensaio de um ou mais produtos químicos em estudo em paralelo com um controlo negativo e um controlo positivo.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS*): Sistema 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 correspondentes elementos de comunicação, 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).

Substância: Um elemento químico e os seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo os aditivos necessários para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo os solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Substância monocomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside no facto de a primeira ser obtida misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Taxa de falsos negativos: Proporção das substâncias positivas que o método de ensaio considera erradamente negativas. É um dos indicadores da eficiência dos métodos.

Taxa de falsos positivos: Proporção das substâncias negativas que o método de ensaio considera erradamente positivas. É um dos indicadores da eficiência dos métodos.

ULOQ: Limite de quantificação superior.

UPLC: Cromatografia líquida de muito alta resolução.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou matérias biológicas.

Viabilidade dos tecidos: Parâmetro que mede a atividade total de uma população celular num tecido reconstruído e a sua capacidade para reduzir o corante vital MTT, capacidade esse que, consoante o parâmetro determinado e do tipo de ensaio realizado, está correlacionada com o número total de células vivas e/ou com a vitalidade dessas células.

VRM: Método de referência validado.

VRM1: O EIT da EpiOcular™ é referido como «método de referência validado 1».

VRM2: O EIT HCE da SkinEthic™ é referido como «método de referência validado 2».

Apêndice 2

PRINCIPAIS COMPONENTES DOS ENSAIOS RHCE VALIDADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITAM DE CLASSIFICAÇÃO E ROTULAGEM EM MATÉRIA DE IRRITAÇÃO OCULAR OU LESÕES OCULARES GRAVES

Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Protocolos	Líquidos (pipetáveis a 37 °C ±1 °C ou a temperaturas mais baixas durante 15 min)	Sólidos (não pipetáveis)	Líquidos e viscosos (pipetáveis)	Sólidos (não pipetáveis)
Superfície do modelo	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Número de tecidos replicados	Pelo menos 2	Pelo menos 2	Pelo menos 2	Pelo menos 2
Controlo prévio de interferência cromática	50 µl + 1 ml H ₂ O durante 60 min a 37±2°C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH (produtos químicos em estudo não corados), ou 50 µl + 2 ml de mistura de isopropanol durante 2-3 horas à temperatura ambiente (produtos químicos corados) →Se a densidade ótica do produto químico em estudo a 570±20 nm, após subtração da for superior a 0,08 (o que corresponde a cerca de 5 % da DO total do controlo negativo), devem realizar-se controlos adaptados <i>in vivo</i> .	50 mg + 1 ml H ₂ O durante 60 min a 37±2°C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % à temperatura ambiente (produtos químicos não corados) e/ou 50 mg + 2 ml de mistura de isopropanol durante 2 a 3 horas à temperatura ambiente (produtos químicos de ensaio corados e não corados) →Se a densidade ótica do produto químico em estudo a 570±20 nm, após subtração da densidade ótica do isopropanol ou da água, for superior a 0,08 (o que corresponde a cerca de 5 % do total da DO de controlo negativo), devem realizar-se controlos adaptados <i>in vivo</i> .	10 µl + 90 µl H ₂ O misturados durante 30 ±2 min à temperatura ambiente (temperatura ambiente: 18-28 °C) →se o produto químico em estudo for corado, devem realizar-se controlos adaptados <i>in vivo</i>	10 mg + 90 µl H ₂ O misturados durante 30±2 min à temperatura ambiente →se o produto químico em estudo for corado, devem realizar-se controlos adaptados <i>in vivo</i>

Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)
Controlo prévio da redução direta do MTT	50 µl+1 ml de MTT 1 mg/ml de solução durante 180±15 min a 37±2 °C, 5±1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa →se a solução ficar de cor azul/púrpura, devem realizar-se controlos adaptados «mortos por congelamento» (utilizam-se como controlo negativo 50 µl de água desionizada estéril numa solução de MTT)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml de solução durante 180 ±15 min a 37±2 °C, 5±1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa →se a solução ficar azul/púrpura, devem realizar-se controlos adaptados «mortos por congelamento». (utilizam-se como controlo negativo 50 µl de água desionizada estéril numa solução de MTT).	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml de solução durante 180±15 min a 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥95 % de humidade relativa →se a solução ficar azul/púrpura, devem realizar-se controlos adaptados à água (utilizam-se como controlo negativo 30 µl de água desionizada estéril numa solução de MTT).
Pré-tratamento	20 µl de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺ durante 30 ± 2 min a 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa, ao abrigo da luz.	20 µl de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺ durante 30 ± 2 min a 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa, ao abrigo da luz.	-
Doses e aplicação do tratamento	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) utilizando um aparelho calibrado (por exemplo, uma colher nivelada calibrada para conter 50 mg de cloreto de sódio).	30 µl de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²) Para produtos viscosos, utilizar uma malha de nylon
Tempo e temperatura de exposição	30 min (± 2 min) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa	6 horas (± 0,25 h) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa	4 horas (± 0,1 h) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa

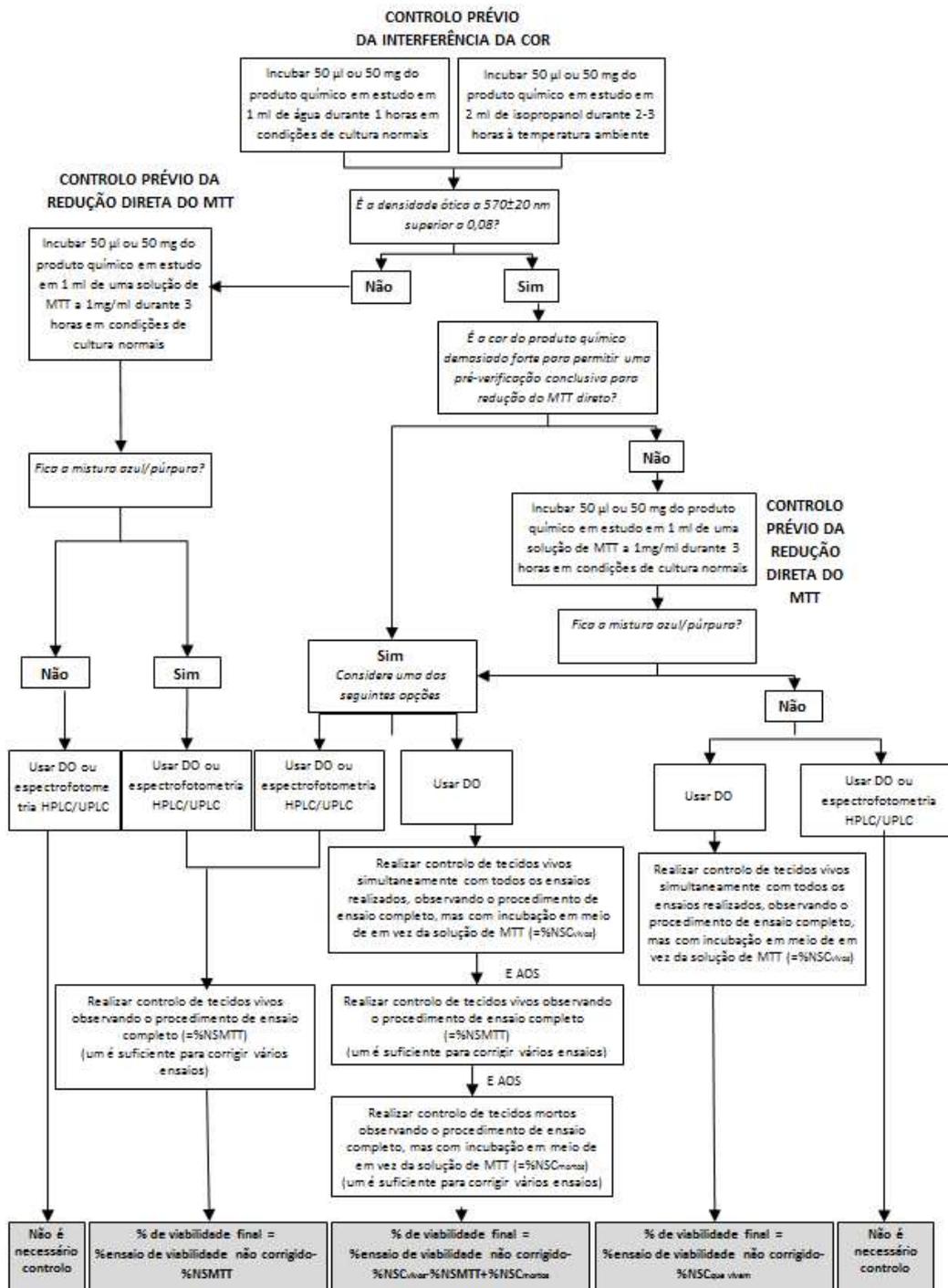
Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Lavagem à temperatura ambiente	3 vezes em 100 ml de DPSB sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	3 vezes em 100 ml de DPSB sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	20 ml de DPSB sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	25 ml de DPSB sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Imersão pós-exposição	12 min (± 2 min) à temperatura ambiente em meio de cultura	25 min (± 2 min) à temperatura ambiente em meio de cultura	30 min (± 2 min) a 37 °C, 5 % CO_2 , 95 % de humidade relativa em meio de cultura	30 min (± 2 min) à temperatura ambiente em meio de cultura
Incubação pós-exposição	120 min (± 15 min) em meio de cultura a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 % de humidade relativa	18 h ($\pm 0,25$ h) em meio de cultura a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 % de humidade relativa	nenhuma	18 h ($\pm 0,5$ h) em meio de cultura a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 % de humidade relativa
Controlo negativo	50 μl H_2O Ensaio paralelo	50 μl H_2O Ensaio paralelo	30 ± 2 μl de DPBS sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Ensaio paralelo	30 ± 2 μl de DPBS sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Ensaio paralelo
Controlo positivo	50 μl de acetato de metilo Ensaio paralelo	50 μl de acetato de metilo Ensaio paralelo	30 ± 2 μl de acetato de metilo Ensaio paralelo	30 ± 2 μl de acetato de metilo Ensaio paralelo

Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)	EIT da SkinEthic™ (VRM 2)
Solução de MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Tempo e temperatura de incubação do MTT	180 min (± 15 min) a 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa	180 min (± 15 min) a 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa
Extração do solvente	2 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção por perfuração do tecido)	2 ml de isopropanol (extração do fundo da inserção por perfuração do tecido)
Tempo e temperatura de extração	2-3 horas com agitação (~20 rpm) à temperatura ambiente ou de um dia para o outro a 4-10 °C	4 h com agitação (~120 rpm) à temperatura ambiente ou, pelo menos, de um dia para o outro, sem agitação, a 4-10 °C
Leitura da densidade ótica	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	570 nm (540 - 600 nm) sem filtro de referência
Controlo da qualidade dos tecidos	Tratamento com 100 µl de Triton X-100 a 0,3 % 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	30 minutos de tratamento com SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml

Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)	EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)
Critérios de aceitação	<p>1. A densidade média dos replicados tratados com o controlo negativo deve ser > 0,8 e < 2,5</p> <p>2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 30 minutos com o controlo positivo, expressa em % da amostra de controlo negativa, deve ser < 50 %.</p> <p>3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.</p>	<p>1. A densidade média dos replicados tratados com o controlo negativo deve ser > 1,0 e ≤ 2,5</p> <p>2. A viabilidade média dos replicados de tecidos expostos durante 30 minutos com o controlo positivo, expressa em % do controlo negativo, deve ser ≤ 30 %</p> <p>3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.</p>
		<p>1. A densidade média dos tecidos replicados tratados com o controlo negativo deve ser > 1,0 e ≤ 2,5</p> <p>2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 4 horas com o controlo positivo, expressa em % do controlo negativo, deve ser ≤ 20 %</p> <p>3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.</p>

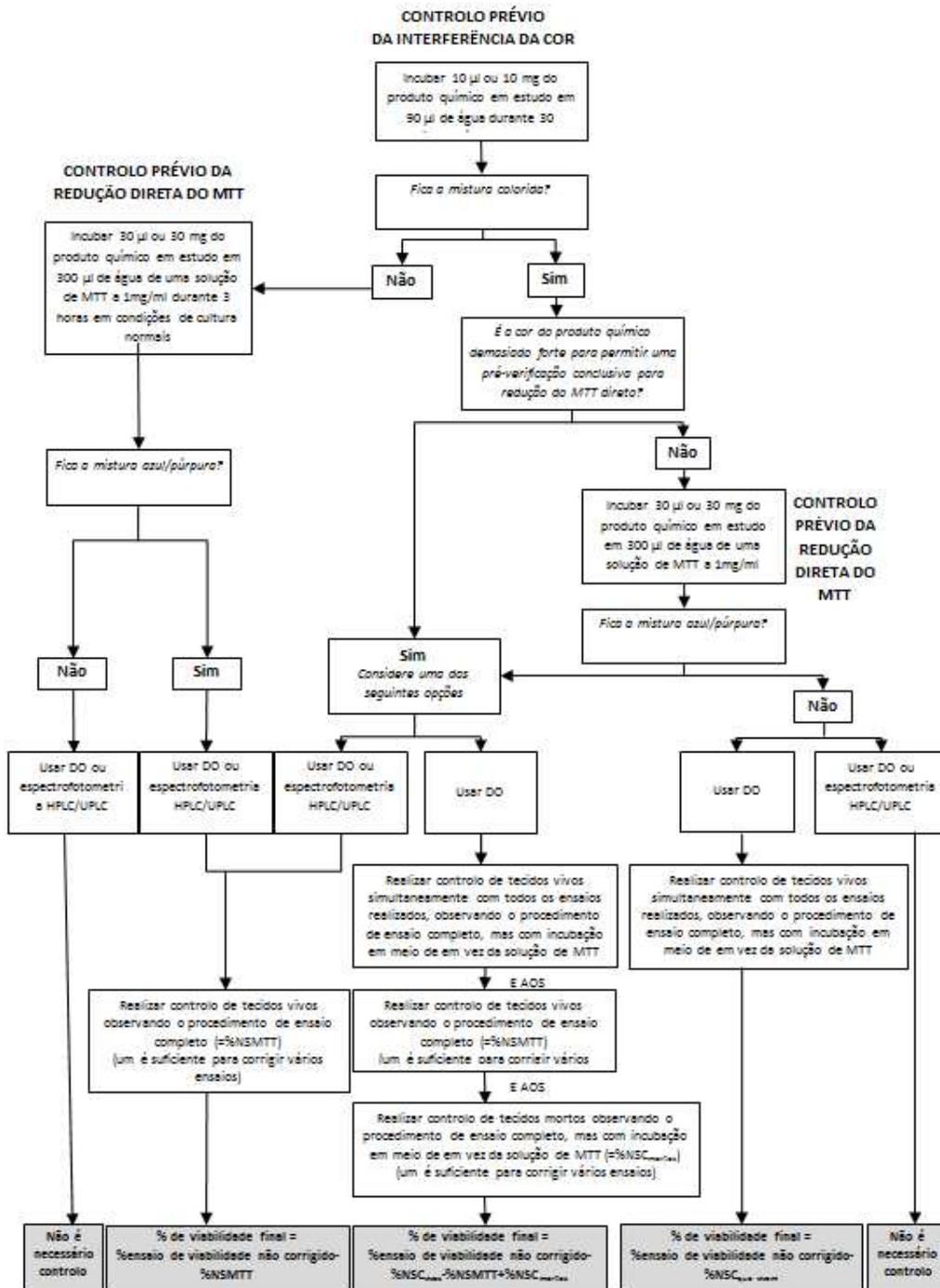
Apêndice 3

FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DE ORIENTAÇÃO PARA IDENTIFICAR E MANUSEAR OS REDUTORES DIRETOS DO MTT E/OU OS PRODUTOS QUÍMICOS INTERFERENTES CROMÁTICOS COM BASE NOS PON DO VRM1



Apêndice 4

FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DE ORIENTAÇÃO PARA IDENTIFICAR E MANUSEAR OS REDUTORES DIRETOS DO MTT E/OU OS PRODUTOS QUÍMICOS INTERFERENTES CROMÁTICOS COM BASE NOS PON DO VRM2



Apêndice 5

PRINCIPAIS PARÂMETROS E CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A QUALIFICAÇÃO DE UM SISTEMA DE ESPETROFOTOMETRIA HPLC/UPLC PARA MEDIÇÃO DO MTT FORMAZANO EXTRAÍDO DE TECIDOS RhCE

Parâmetro	Protocolo derivado do documento de orientação da FDA (36) (38)	Critérios de aceitação
Seletividade	Análise do isopropanol, em branco vivo (extrato de isopropanol extraído de tecido RhCE vivo sem qualquer tratamento), em branco morto (extrato de isopropanol sem qualquer tratamento extraído de tecido RhCE morto sem qualquer tratamento) e de um corante (por exemplo, azul de metileno)	$\frac{\text{Área}_{\text{interferência}}}{\text{Área}_{\text{LLOQ}}} \leq 20\%$ da $\text{Área}_{\text{LLOQ}}$ ⁽¹⁾
Precisão	Controlos de qualidade (MTT formazano a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) em isopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % or ≤ 20 % para o LLOQ
Exatidão	Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % ou ≤ 20 % para LLOQ
Efeito matriz	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 5)	85 % ≤ % efeito de matriz ≤ 115 %
Passagem	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ ⁽²⁾	$\frac{\text{Área}_{\text{interferência}}}{\text{Área}_{\text{LLOQ}}} \leq 20\%$ da $\text{Área}_{\text{LLOQ}}$
Reprodutibilidade (intradiaária)	3 curvas de calibração independentes (com base em 6 diluições consecutivas de 1/3 de MTT formazano em isopropanol, com início em ULOQ, isto é, 200 µg/ml); Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curvas de calibração: % Dev ≤ 15 % ou ≤ 20 % para LLOQ
Reprodutibilidade (intradiaária)	Dia 1: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 2: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 3: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3)	Controlos de qualidade: % Dev ≤ 15 % e CV ≤ 15 %
Estabilidade a curto prazo do MTT formazano em extratos de tecidos RhCE	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisados no dia da preparação e após 24 horas de armazenagem à temperatura ambiente.	% Dev ≤ 15 %
Estabilidade a longo prazo do MTT formazano em extratos de tecidos RhCE, se necessário	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisados no dia da preparação e após vários dias de armazenagem a -20 °C	% Dev ≤ 15 %

⁽¹⁾ LLOQ: Limite inferior de quantificação, definido de forma a abranger 1-2 % de viabilidade dos tecidos, ou seja, 0,8 µg/ml.

⁽²⁾ ULOQ: Limite superior de quantificação, definido como pelo menos duas vezes superior à mais elevada concentração de MTT formazano em extratos de isopropanol obtidos de controlos negativos (~70 µg/ml no VRM), ou seja, 200 µg/ml.

B.70 ENSAIOS *IN VITRO* DE RECETOR DE ESTROGÉNIO HUMANO RECOMBINANTE PARA DETEÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS COM AFINIDADE LIGANTE COM O ER

INTRODUÇÃO GERAL

Método de ensaio baseado na *Test Guideline* da OCDE

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 493 (2015) da OCDE. A *Test Guideline* 493 é uma diretriz de ensaio baseada no desempenho (PBTG), que descreve a metodologia para os ensaios *in vitro* de recetor de estrogénio humano recombinante para a deteção de produtos químicos com afinidade ligante com recetores de estrogénios (ensaios de ligação do hrER). É composto por vários métodos de ensaio mecânica e funcionalmente semelhantes para a identificação de ligantes do recetor de estrogénio (i.e., ER α) e deve facilitar o desenvolvimento de métodos de ensaio novos ou modificados de acordo com os princípios de validação estabelecidos no *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Composition for Hazard Assessment* (1) da OCDE. Os métodos de ensaio de referência inteiramente validados (apêndice 2 e apêndice 3) que constituem a base deste PBTG são:

- O *In Vitro Estrogen Recetor (ER) Binding Assay Using a Full Length Human Recombinant ER α* [ensaio *in vitro* de ligação do recetor de estrogénio com um ER α recombinante inteiro humano] de Freyberger-Wilson (FW) (2) e
- O *In Vitro Estrogen Recetor Binding Assay Using a Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein* (ensaio *in vitro* de ligação do recetor de estrogénio através de uma proteína ligando recombinante de ligação do Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) (2).

Existem normas de desempenho (PS) (3) para facilitar o desenvolvimento e a validação de métodos de ensaio similares para o mesmo parâmetro de perigo e permitir a alteração oportuna do PBTG 493, por forma a que possam ser adicionados novos ensaios similares a um PBTG atualizado. No entanto, só serão adicionados ensaios semelhantes após análise e aprovação pela OCDE do cumprimento das normas de desempenho. Os ensaios incluídos no método TG 493 podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as necessidades dos países membros da OCDE quanto a resultados de ensaios de ligação de recetores de estrogénio, beneficiando, em simultâneo, da aceitação mútua de dados da OCDE.

Antecedentes e princípios dos ensaios incluídos no presente método de ensaio

2. A OCDE iniciou em 1998 uma atividade altamente prioritária com o objetivo de rever as diretrizes em vigor para a pesquisa e o ensaio de produtos químicos com possíveis efeitos de perturbação endócrina, bem como de estabelecer novas diretrizes. O quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos potencialmente perturbadores do sistema endócrino foi revisto em 2012. O quadro conceptual original e o quadro revisto constam, como anexo, do *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* (4). O quadro conceptual inclui cinco níveis, correspondendo cada nível a um nível diferente de complexidade biológica. Os ensaios de ligação do RE descritos no presente método de ensaio são de nível 2, que abrange ensaios *in vitro* que proporcionam dados sobre um ou vários mecanismos/vias endócrinos selecionados. O método refere-se a ensaios de ligação de recetores *in vitro*, concebidos para identificar ligandos para o recetor de estrogénios humanos alfa (ER α).
3. A relevância do ensaio de ligação do ER *in vitro* para funções biológicas já foi claramente demonstrada. Os ensaios de ligação do ER são concebidos para identificar produtos químicos suscetíveis de perturbar a via hormonal do estrogénio e têm sido amplamente utilizados nas duas últimas décadas para caracterizar a distribuição dos tecidos do ER, bem como para identificar agonistas/antagonistas do ER. Estes ensaios refletem a interação ligando-recetor, que constitui a primeira etapa da via de sinalização do estrogénio e é essencial para a função reprodutora em todos os vertebrados.

4. A interação dos estrogénios com os ER pode afetar a transcrição dos genes controlados pelo estrogénio e induzir efeitos não genómicos passíveis de conduzir à indução ou inibição de processos celulares, incluindo os necessários para a proliferação celular, o desenvolvimento fetal normal e a função reprodutora (5) (6) (7). A perturbação dos sistemas estrogénicos normais pode provocar efeitos nocivos no desenvolvimento normal (ontogénese), na saúde reprodutiva e na integridade do aparelho reprodutor. Uma sinalização inadequada do ER pode provocar efeitos como o aumento de risco de cancro hormono-dependente, perturbações da fertilidade e alterações no crescimento e desenvolvimento fetais (8).
5. Os ensaios obrigatórios *in vitro* baseiam-se numa interação direta de uma substância com um ligando de ligação do recetor específico que regula a transcrição génica. O principal componente do ensaio de ligação do recetor de estrogénio alfa recombinante humano (hrER α) mede a capacidade de um ligando com marcação radioativa ([³H]17 β -estradiol) para se fixar ao ER na presença de concentrações crescentes de um produto químico concorrente. Os produtos químicos em estudo que possuem uma elevada afinidade para o ER competem com o ligando com marcação radioativa a uma concentração mais baixa comparativamente com os produtos químicos com menor afinidade para o recetor. O presente ensaio é composto por dois componentes principais: uma experiência de ligantes por saturação com vista a caracterizar os parâmetros da interação recetor-ligando e a documentação da especificidade do ER, seguida de uma experiência de ligantes competitivos que caracteriza a concorrência entre um produto químico em estudo e um ligando com marcação radioativa para ligação ao ER.
6. Os estudos de validação do CER1 e os ensaios de ligação de FW demonstraram a sua adequação e fiabilidade para o fim a que se destinam (2).
7. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio constam do apêndice 1.

Âmbito de aplicação e limitações relacionadas com os ensaios de ligação do recetor

8. Estes ensaios são propostos para efeitos de análise e de definição de prioridades, mas podem também fornecer informações para um evento de iniciação molecular (MIE) passível de ser utilizado numa abordagem de ponderação da suficiência da prova. Abordam a ligação do produto químico ao domínio de ligação do ligando do ER α num sistema *in vitro*. Os resultados não devem, pois, ser extrapolados diretamente para o complexo de sinalização e regulação do sistema endócrino intacto *in vivo*.
9. A ligação do ligando natural (17 β -estradiol) constitui a primeira etapa de uma série de eventos moleculares que ativam a transcrição dos genes-alvo e, em última análise, culminam numa mudança fisiológica (9). Assim, a ligação ao domínio de ligação do ligando do ER α é considerada um dos principais mecanismos da desregulação do sistema endócrino (ED) mediada pelo ER, embora haja outros mecanismos através dos quais pode ocorrer a desregulação do sistema endócrino, incluindo: i) interações com pontos de ER α diferentes da bolsa de ligação do ligando; ii) interações com outros recetores relevantes para a sinalização do estrogénio, recetores de estrogénios emparelhados com o ER α e proteína-G e outros recetores e sistemas enzimáticos do sistema endócrino; iii) a síntese hormonal; iv) ativação metabólica e/ou a inativação hormonal; v) distribuição de hormonas aos tecidos-alvo; vi) eliminação de hormonas do organismo. Nenhum dos ensaios segundo o presente método aborda estes modos de ação.

10. O presente método de ensaio incide na capacidade das substâncias de se fixarem ao ER α humano e não estabelece qualquer distinção entre agonistas ou antagonistas do ER α . Os ensaios não abordam outros eventos a jusante, como a transcrição génica ou as alterações fisiológicas. Tendo em conta que, durante a validação, apenas foram utilizadas substâncias monocomponentes, não foi abordada a aplicabilidade ao estudo de misturas. Considera-se, porém, que os ensaios são tecnicamente aplicáveis a substâncias e misturas multicomponentes. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.
11. Os sistemas recetores sem células não têm capacidade metabólica intrínseca e não foram validados em combinação com sistemas enzimáticos metabólicos. No entanto, poderá ser possível integrar a atividade metabólica numa conceção do estudo, mas isso exigirá novos esforços de validação.
12. Os produtos químicos suscetíveis de desnaturarem as proteínas do recetor, como os tensoativos ou as substâncias químicas que possam alterar o pH do tampão de ensaio, não podem ser ensaiados, ou apenas o podem ser em concentrações que não provoquem tais interações. Caso contrário, a gama de concentrações que pode ser estudada nos ensaios de um produto químico em estudo é limitada pela sua solubilidade no tampão.
13. A título informativo, o quadro 1 fornece os resultados do ensaio para as 24 substâncias que foram ensaiadas em ambos os ensaios plenamente validados descritos no presente método. Destas substâncias, 17 são classificadas como ligantes do ER e 6 como não ligantes, com base em relatórios publicados, incluindo ensaios *in vitro* para a ativação transcricional do ER e/ou o ensaio uterotrófico (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Em referência aos dados resumidos no quadro 1, houve um acordo de quase 100 % entre os dois ensaios sobre as classificações de todas as substâncias até 10^{-4} M, e cada substância foi corretamente classificada como ligante ou não ligante. Durante os estudos de validação, são fornecidas informações suplementares sobre este grupo de substâncias, bem como sobre outras substâncias ensaiadas com os ensaios de ligação para efeitos de ER nos estudos de validação, de acordo com as normas de desempenho para o ensaio vinculativo (3), apêndice 2 (quadros 1, 2 e 3).

Quadro 1
Classificação de substâncias como ligantes ou não ligantes quando ensaiados com os ensaios de ligação de FW e do de hrER do CERI hrER, em comparação com a resposta esperada

	Denominação da substância	N.º CAS	Resposta esperada	Ensaio de FW		Ensaio do CERI		Produto químico MESH Classe	Classe de produto
				Concentração Gama (M)	Classificação	Concentração Gama (M)	Classificação		
1	17β-Estradiol	50-28-2	Ligante	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Ligante	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Ligante	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
2	Noretinodrel	68-23-5	Ligante	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁴	Ligante	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁴	Ligante	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
3	Norentindrona	68-22-4	Ligante	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁴	Ligante	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁴	Ligante	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
4	Ftalato de di- <i>n</i> -butilo	84-74-2	Não ligante (*)	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻⁴	Não ligante (**) (†)	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻⁴	Não ligante (**) (†)	Hidrocarboneto cíclico, éster	Plastificante, Produto químico intermédio
5	DES	56-53-1	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
6	17α-Etinilestradiol	57-63-6	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
7	Meso-hexesterol	84-16-2	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
8	Genisteína	446-72-0	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	Hidrocarboneto heterocíclico, flavonoide	Produto natural
9	Equol	531-95-3	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	Fitoestrogénio Me-tabolito	Produto natural
10	Butilparabeno (4-hidroxiben-zoato de <i>n</i> -butilo)	94-26-8	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Ligante	Parabeno	Conservante

	Denominação da substância	N.º CAS	Resposta esperada	Ensaio de FW		Ensaio do CER1		Produto químico MESH Classe	Classe de produto
				Concentração Gama (M)	Classificação	Concentração Gama (M)	Classificação		
11	Nonilfenol (mistura)	84852-15-3	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Alquilfenol	Composto intermédio
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Organoclorado	Inseticida
13	Corticosterona	50-22-6	Não ligante (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	Esteróide	Produto natural
14	Zearalenona	17924-92-4	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto heterocíclico, lactona	Produto natural
15	Tamoxifeno	10540-29-1	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico, agente veterinário
16	5 α -Di-hidrotestosterona	521-18-6	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Esteróide não fenólico	Produto natural
17	Bisfenol A	80-05-7	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Fenol	Produto químico intermédio
18	4- <i>n</i> -Heptilfenol	1987-50-4	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Equívoco (a)	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Alquilfenol	Intermédio
19	Kepona (Clordecona)	143-50-0	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto halogenado	Pesticida
20	Benzo(a)antraceno	56-55-3	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Não ligante (b)	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Não ligante (b)	Hidrocarboneto aromático	Intermédio
21	Enterolactona	78473-71-9	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Fitoestrogénio	Produto natural
22	Progesterona	57-83-0	Não ligante (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	Esteróide	Produto natural

Denominação da substância	N.º CAS	Resposta esperada	Ensaio de FW		Ensaio do CER1		Produto químico MESH Classe	Classe de produto
			Concentração Gama (M)	Classificação	Concentração Gama (M)	Classificação		
23	2943-75-1	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Não ligante	Silano	Modificador de superfície
24	Atrazina	Não ligante (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	Composto heterocíclico	Herbicida

(*) Limite de solubilidade $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) A utilização e classificação de fralato de di-*n*-butilo (DBP) como não ligante baseou-se em ensaios até 10^{-4} M, porque se observou, em alguns laboratórios, durante os estudos de pré-validação, que a substância é insolúvel a 10^{-3} M (por exemplo, turbidez).

(†) Durante o estudo de validação, o fralato de di-*n*-butilo (DBP) foi ensaiado como uma substância codificada em concentrações até 10^{-3} M. Nestas condições, alguns laboratórios observaram uma diminuição da capacidade de ligação do ligando radioativo na concentração mais elevada (10^{-3} M) e/ou uma curva ambígua. Para estas séries, o DBP foi classificado como «inconclusivo» ou «ligante» em 3/5 laboratórios, com o ensaio do CERIT e em 5/6 laboratórios com o ensaio de FW (ver referência bibliográfica (2), secções IV.B.3a, b e VI.A).

(‡) A classificação não era compatível com a classificação esperada. A classificação do 4-*n*-heptilfenol como «inconclusivo» ou «não ligante» por 3/5 laboratórios, resultou numa classificação média de «inconclusivo». Uma inspeção mais atenta revelou que tal se deveu a limitações de solubilidade do produto químico que impediram a produção de uma curva de ligantes inteira.

(§) Durante o estudo de validação, o benz(a)antraceno foi reclassificado como «não ligante» (ou seja, negativo), com base na literatura que demonstra que a atividade estrogénica *in vitro* relatada para esta substância (16) depende essencialmente da sua ativação metabólica (17)(18). Não era previsível a ativação metabólica enzimática da substância nos ensaios de ligação acelulares utilizados neste estudo de validação interlaboratorial. Assim, a classificação correta para esta substância é «não ligante» quando é utilizado nas condições experimentais dos ensaios de FW e do CER1.

COMPONENTES DO ENSAIO DE FIXAÇÃO HRER

Componentes de ensaio essenciais

14. O presente método de ensaio aplica-se a ensaios que utilizam um recetor ER e um ligando suficientemente forte ao recetor, que pode ser utilizado como marcador/rastreador para o ensaio e pode ser deslocado com concentrações crescentes de um produto químico em estudo. Os ensaios de ligação contêm os dois componentes principais seguintes: 1) ligantes por saturação; 2) ligantes competitivos. O ensaio de saturação é utilizado para confirmar a especificidade e a atividade das preparações do recetor, enquanto a experiência de ligantes competitivos é utilizada para avaliar a capacidade de um produto químico para se fixar ao hrER.

Controlos

15. Deve ser descrever-se a base dos estrogénios e dos controlos de referência paralelos propostos. Os controlos paralelos [de solvente (veículo), positivos (ER, ligante, afinidade forte e fraca), negativo (não ligante)], consoante o caso, servem como indicação de que o ensaio está a progredir em condições adequadas e fornecem uma base para comparações entre experiências; geralmente, fazem parte dos critérios de aceitabilidade de uma experiência (1). As curvas de concentração inteiras para os estrogénios e os controlos de referência (por exemplo, ligante fraco e não ligante) devem ser utilizadas numa única placa em cada série de ensaios. Todas as outras placas devem conter: 1) uma concentração elevada (aproximadamente o deslocamento total do ligando com marcação radioativa) e média (aproximadamente IC₅₀), cada um dos E2 e do ligante fraco em triplicado; 2) controlo do solvente e ligante não específico, ambos em triplicado.

Procedimentos normalizados de controlo de qualidade

16. Devem ser aplicados os procedimentos normalizados de controlo da qualidade descritos para cada ensaio, a fim de garantir recetores ativos, concentrações corretas de produtos químicos, estabilidade dos limites de segurança ao longo de múltiplas replicações e manutenção da capacidade de fornecer as respostas ER-ligante esperadas ao longo do tempo.

Demonstração da competência técnica do laboratório

17. Antes de ensaiarem produtos químicos desconhecidos com qualquer dos ensaios do presente método, os laboratórios devem demonstrar competência técnica na realização do ensaio através da realização de ensaios de saturação para confirmar a especificidade e a atividade de preparação do ER e ensaios de ligação competitivos com os estrogénios e os controlos de referência (ligante fraco e não ligante). O laboratório deve estabelecer uma base de dados históricos com resultados relativos aos estrogénios e aos controlos de referência gerados no decurso de 3-5 experiências independentes realizadas em dias diferentes. Estas experiências serão a base dos estrogénios e dos controlos de referência históricos do laboratório e serão utilizadas para avaliação parcial da aceitabilidade do ensaio para futuras séries.
18. A capacidade de resposta do sistema de ensaio será também confirmada através do ensaio das substâncias indicadas no quadro 2. A lista de substâncias para demonstração de competência técnica é um subconjunto das substâncias de referência constantes das normas de desempenho para os ensaios de ligação do ER (3). Estas substâncias estão disponíveis no comércio, representam as classes de produtos químicos geralmente associadas à atividade de ligantes do ER e apresentam uma gama de potência adequada e previsível para ligantes de ER (ou seja, de forte a fraco) e não ligantes (ou seja, negativo). Para cada substância de demonstração de competência técnica, as concentrações ensaiadas devem abranger o intervalo de variação indicado no quadro 2. Devem efetuar-se pelo menos três experiências relativamente a cada substância, e os resultados devem ser conformes com a atividade química esperada. Cada experiência deve ser realizada de forma independente (ou seja, com diluições frescas de recetores, produtos químicos e reagentes), com três replicados para cada concentração. A competência é demonstrada por uma classificação correta (positiva/negativa) de cada uma das substâncias. Os ensaios de demonstração da competência técnica devem ser realizados por todos os técnicos que aprendem a realizar os ensaios.

Quadro 2

Lista de substância de controlo e de demonstração da competência técnica para ensaios de ligação competitivos do hrER ⁽¹⁾

N.º	Denominação da substância	N.º CAS ⁽²⁾	Resposta prevista ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	Gama de concentrações de ensaio (M)	Classe química MeSH ⁽⁵⁾	Classe de produtos ⁽⁶⁾
Controlos (estrogénios de referência, ligante fraco, não ligante)						
1	17β-Estradiol	50-28-2	Ligante	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
2	Noretinodrel (ou) Noretinodrona	68-23-5 (ou) 68-22-4	Ligante	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁶	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
3	Octiltrióxissilano	2943-75-1	Não ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Silano	Modificador de superfície
Substâncias para a demonstração de competência técnica ⁽⁶⁾						
4	Dietilestilbestero	56-53-1	Ligante	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Hydrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
5	17α-Etimilestradiol	57-63-6	Ligante	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
6	Meso-hexestero	84-16-2	Ligante	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Hydrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
7	Tamoxifeno	10540-29-1	Ligante	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Hydrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico, agente veterinário
8	Genisteína	446-72-0	Ligante	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Composto heterocíclico, flavonoide	Produto natural

N.º	Denominação da substância	N.º CAS (2)	Resposta prevista (3) (4)	Gama de concentrações de ensaio (M)	Classe química MeSH (5)	Classe de produtos (6)
9	Bisfenol A	80-05-7	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenol	Produto químico intermédio
10	Zearalenona	17924-92-4	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Composto heterocíclico, lactona	Produto natural
11	Butilparabeno	94-26-8	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Ácido carboxílico, fenol	Conservante
12	Atrazina	1912-24-9	Não ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Composto heterocíclico	Herbicida
13	Ftalato de di-n-butilo (DBP) (7)	84-74-2	Não ligante (8)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hidrocarboneto cíclico, éster	Plastificante, Produto químico intermédio
14	Corticosterona	50-22-6	Não ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Esteróide	Produto natural

(1) Se uma substância de demonstração de competência técnica deixar de estar comercialmente disponível, pode ser usada uma substância com a mesma classificação ligante, potência comparável e da mesma classe de produtos químicos.

(2) Abreviaturas: N.º de registo CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

(3) Classificação como ligante ou não ligante do ERαC durante o estudo de validação dos ensaios de ligação de hrER de FW e do CER1 (2).

(4) A atividade de ligação do ER baseou-se em informações constantes do ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods (31), bem como em dados empíricos e informações obtidas a partir de estudos incluídos nas referências bibliográficas publicados e analisados (11) (12) (13) (14) (15).

(5) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes de produtos químicos com recurso à U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), uma classificação normalizada e internacionalmente reconhecida (disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

(6) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes químicas com recurso à U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HDPB>)

(7) O DBP pode ser utilizado como não ligante de controlo ensaiado com uma concentração máxima de 10^{-4} M.

(8) O limite de solubilidade desta substância é 10^{-4} M. A utilização e classificação do ftalato de di-n-butilo (DBP) como não ligante basearam-se em ensaios até 10^{-4} M, porque se observou, em alguns laboratórios, durante os estudos de pré-validação, que a substância é insolúvel a 10^{-3} M (por exemplo, turbidez).

Ensaio de solubilidade e determinação da gama de concentrações de produtos químicos em estudo

19. Deve efetuar-se um ensaio preliminar para determinar o limite de solubilidade de cada produto químico em estudo e identificar a gama de concentrações adequadas a utilizar no ensaio. O limite de solubilidade de cada produto químico em estudo deve ser determinado inicialmente no solvente e confirmado em condições de ensaio. A concentração final estudada no ensaio não deve exceder 1 mM. O ensaio de determinação da gama de concentrações consiste num controlo de solvente, a par de oito diluições sequenciais, a partir da concentração máxima aceitável (por ex., 1 mM ou inferior, com base no limite de solubilidade), e da presença de turbidez ou precipitado perceptível. As concentrações na segunda e na terceira experiência devem ser ajustadas na medida do necessário para caracterizar melhor a curva concentração-resposta.

Critérios de aceitabilidade dos ensaios

20. A aceitação ou rejeição de uma série de ensaios baseia-se na avaliação dos resultados obtidos para os estrogénios e controlos de referência utilizados para cada experiência. Em primeiro lugar, para a placa 1, as curvas de concentração inteiras para os controlos de referência de cada experiência devem cumprir as medidas de desempenho relativas aos parâmetros das curvas (p. ex., IC_{50} e curva de Hill), com base nos resultados relatados para os protocolos correspondentes relativos aos ensaios do CER1 e ensaios de FW de (apêndices 2 e 3) e nos dados históricos de controlo do laboratório que realiza o ensaio. Todos os controlos (estrogénios de referência, ligante fraco e não ligante) devem ser corretamente classificados para cada experiência. Em segundo lugar, os controlos de todas as placas subsequentes têm de ser avaliados em termos de coerência com a placa 1. Deve utilizar-se uma gama de concentrações do produto químico em estudo suficiente para definir com clareza o topo da curva do ligante competitivo. A variabilidade dos replicados em cada concentração do produto químico em estudo, bem como entre os três ensaios independentes, deve ser razoável e cientificamente aceitável. A capacidade para efetuar o ensaio de forma consistente deve ser demonstrada através da constituição e da manutenção de uma base de dados histórica para os estrogénios de referência. Os desvios-padrão (DP) ou os coeficientes de variação (CV) para as médias dos estrogénios de referência e para os parâmetros das curvas do ligante fraco de controlo de várias experiências podem ser utilizados como indicadores da reprodutibilidade interna do laboratório. Devem utilizar-se critérios profissionais para a avaliação dos resultados do controlo das placas de cada série de ensaios, bem como para cada produto químico em estudo.

Além disso, devem ser respeitados os seguintes princípios relativos aos critérios de aceitabilidade:

- Os dados devem ser suficientes para uma avaliação quantitativa do ligante do ER,
- As concentrações ensaiadas devem manter-se dentro da gama de solubilidade dos produtos químicos em estudo.

Análise dos dados

21. O procedimento definido para a análise dos dados relativos aos ligantes por saturação e competitivo devem respeitar os princípios fundamentais da caracterização das interações recetor-ligando. Normalmente, os dados relativos aos ligantes por saturação são analisados por recurso a um modelo de regressão não linear que contabiliza a ligação total e não específica. Pode ser necessária uma correção por depleção de ligantes [ex. Swillens, 1995 (19)] aquando da determinação de B_{\max} e K_d . Os dados provenientes de ensaios de ligação competitivos são geralmente *software* transformados [por exemplo, percentagem de ligação específica e concentração do produto químico em estudo ($\log M$)]. Para cada produto químico em estudo, as estimativas de $\log(IC_{50})$ devem ser determinadas com recurso a um *software* de ajustamento de curva não linear adequado, a fim de a adaptar à equação de quatro parâmetros de Hill. Na sequência de uma análise preliminar, devem ser definidos os parâmetros de ajustamento da curva e realizada uma análise visual da forma como os dados do ligante se adaptam à curva de ligação competitiva gerada. Em alguns casos, pode ser necessária uma análise adicional para obter o melhor ajustamento da curva (por exemplo, restrição do topo e/ou da base da curva, utilização da regra dos 10 %, ver apêndice 4 e referência 2 (secção III.A.2)).
22. O cumprimento dos critérios de aceitabilidade (ponto 20) indica que o ensaio está a funcionar corretamente, mas não garante que produz dados exatos. A replicação dos resultados corretos do primeiro ensaio constitui a melhor indicação de que foram produzidos dados exatos.

Critérios gerais de interpretação dos dados

23. Não existe na atualidade um método universalmente aceite para a interpretação dos dados de ligantes de ER. No entanto, tanto a avaliação qualitativa (por exemplo ligante/não ligante) como a quantitativa [p. ex., $\log(\text{IC}_{50})$, afinidade de ligação relativa (RBA), etc.] da atividade mediada pelo ER devem basear-se em dados empíricos e em pareceres científicos sólidos.

Relatório de ensaio

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

Método de ensaio

- ensaio utilizado;

Controlo/referência/produto químico em estudo

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida;
- estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente, se conhecida;
- medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Solvente/veículo:

- caracterização (natureza, fornecedor e lote);
- justificação para a escolha do solvente/veículo;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo, se conhecida;

Recetores:

- origem dos recetores (fornecedor, número de catálogo, lote, espécie do recetor, concentração ativa do recetor fornecido pelo fornecedor, certificação do fornecedor)

- caracterização de recetores (incluindo os resultados dos ligantes por saturação): K_d , $B_{máx}$,
- armazenamento dos recetores
- ligando com marcação radioativa:
- fornecedor, número de catálogo, lote, atividade específica

Condições de realização do ensaio:

- limitações da solubilidade nas condições de ensaio,
- composição do tampão do ligante;
- concentração do recetor;
- concentração do traçador (ou seja, ligante com marcação radioativa);
- concentrações do produto químico em estudo;
- percentagem do veículo no ensaio final;
- tempo e temperatura de incubação;
- método de separação agrupado/isolado;
- controlos positivos e negativos/substâncias de referência;
- critérios definidos para que os ensaios sejam considerados positivos, negativos ou inconclusivos,

Verificação da aceitabilidade:

- valores reais de IC_{50} e da curva de Hill para controlos positivos/substâncias de referência,

Resultados:

- dados brutos agrupados e isolados;
- controlo de confirmação da desnaturação, se for caso disso;
- se existir, a concentração mínima efetiva (LEC);
- valores RBA e/ou IC_{50} , consoante o caso;
- relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;
- análise estatística, se for caso disso, associada a uma medida de erro e confiança (por exemplo, SEM, DP, CV ou IC 95 %) e descrição da forma como os valores foram obtidos;

Discussão dos resultados:

— aplicação da regra dos 10 %

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OCDE (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) OCDE (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: p.20-6.
- (6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): p. 1073-89.
- (7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63-6.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

- (13) OCDE (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.
- (15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Adequação: descrição da relação de um ensaio com o objeto de interesse e da sua importância e utilidade para um determinado fim. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação comporta a exatidão (concordância) de um ensaio (1).

Atividade estrogénica: capacidade de um produto químico reproduzir o 17 β -estradiol na sua capacidade de ligação a recetores de estrogénios. O presente método de ensaio permite detetar a ligação ao hER α .

CF: quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de perturbadores do sistema endócrino.

Competência técnica: capacidade comprovada para efetuar um ensaio de forma adequada antes de ensaiar substâncias desconhecidas.

Crítérios de aceitabilidade: normas mínimas para a realização de controlos experimentais e padrões de referência. Para que uma experiência seja considerada válida, devem ser satisfeitos todos os critérios de aceitabilidade.

CV: coeficiente de variação.

DP: desvio-padrão.

E2: 17 β -estradiol.

ED: desregulação do sistema endócrino.

Ensaio «me-too»: expressão coloquial para designar um método que é, estrutural e funcionalmente, semelhante a um método de ensaio de referência validado e aceite. O termo é sinónimo de «método de ensaio similar».

ER: Recetor de estrogénio.

Estrogénio de referência: 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Exatidão (concordância): grau de concordância entre os resultados do ensaio e um valor de referência aceite. Constitui uma medida da eficiência do método e um aspeto da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar uma proporção de resultados corretos do método de ensaio (1).

Fiabilidade: indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios utilizando o mesmo protocolo. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial.

hER α : recetor alfa de estrogénio humano.

IC₅₀: concentração semimáxima efetiva de um produto químico em estudo inibidor.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods [Comissão de Coordenação da Validação de Métodos Alternativos].

LEC: menor concentração eficaz é a menor concentração do produto químico em estudo que produz uma resposta (ou seja, a menor concentração do produto químico em estudo em que o fator de indução é estatisticamente diferente do controlo do veículo concorrente).

Método de ensaio validado: método de ensaio relativamente ao qual foram realizados estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluindo a exatidão) e fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (1).

Métodos de ensaio de referência: ensaios em que se baseia o PBTG 493.

Normas de desempenho: normas, associadas a um método de ensaio validado, com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um ensaio proposto que seja mecânica e funcionalmente similar. Incluem: (1) componentes essenciais do método de ensaio; (2) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (3) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (1).

PBTG: diretriz de ensaio baseada no desempenho.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

RBA: afinidade de ligação relativa. A RBA de uma substância é calculada como uma percentagem do $\log(IC_{50})$ para a substância relativamente ao $\log(IC_{50})$ para o 17 β -estradiol.

Regra dos 10 %: opção de excluir da análise dados em que a média dos replicados para a percentagem de ligação específica do [³H]17 β -estradiol tenha superior em 10 % ou mais à observada para o valor médio a uma concentração inferior (ver apêndice 4).

Reprodutibilidade interlaboratorial: uma medida do grau em que diferentes laboratórios qualificados que utilizam o mesmo protocolo e testam as mesmas substâncias podem produzir resultados qualitativa e quantitativamente similares. A reprodutibilidade interlaboratorial é determinada durante os processos de pré-validação e validação e indica em que medida um método pode ser transferido com êxito entre laboratórios, igualmente designada «reprodutibilidade entre laboratórios» (1).

Reprodutibilidade intralaboratorial: uma medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório consegue replicar resultados com êxito utilizando o mesmo protocolo, em momentos diferentes. Igualmente designada «reprodutibilidade intralaboratorial» (1).

Substâncias para a demonstração de competência técnica: um subconjunto das substâncias de referência incluídas nas normas de desempenho que pode ser utilizado pelos laboratórios para demonstrar competência técnica com um ensaio normalizado. Os critérios de seleção destas substâncias incluem normalmente o facto de representarem a gama de repostas, estarem comercialmente disponíveis e disporem de dados de referência de elevada qualidade.

Validação: o processo de estabelecimento da fiabilidade e adequação de uma determinada abordagem, método, processo ou avaliação para um determinado fim (1).

Apêndice 2

ENSAIOS *IN VITRO* DE LIGAÇÃO POR SATURAÇÃO E COMPETITIVA AO RECTOR DE ESTROGÉNIO (ERA) COM RECURSO A ERA RECOMBINANTE INTEIRO DE FREYBERGER-WILSON

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. Este ensaio *in vitro* de ligação por saturação e competitiva ao receptor de estrogénio (ER) utiliza o receptor humano inteiro ER α (hrER α), que é produzido em células de insetos infetadas com baculovírus e destas isolado. O protocolo, desenvolvido por Freiberger e Wilson, foi submetido a um estudo de validação internacional em vários laboratórios (2), que demonstrou a sua pertinência e fiabilidade para o fim a que se destina.
2. Este ensaio é um procedimento de análise para identificação de substâncias suscetíveis de se ligarem a toda a extensão do hrER α . É utilizado para determinar a capacidade de um produto químico em estudo para competir com o 17 β -estradiol pela ligação ao hrER α . Os resultados quantitativos do ensaio podem incluir o IC₅₀ (uma medição da concentração do produto químico em estudo necessária para deslocar metade do [³H]17 β -estradiol do hrER α) e as afinidades de ligação relativas dos produtos químicos em estudo para o hrER α em comparação com o 17 β -estradiol. Para fins de análise química, os resultados qualitativos de ensaios aceitáveis podem incluir classificações produtos químicos em estudo como ligantes ou não ligantes do hrER α , ou como inconclusivos com base nos critérios descritos para as curvas de ligação.
3. O ensaio utiliza ligandos radioativos, sendo necessário que o laboratório disponha de uma licença para o manuseamento desses materiais. Todos os procedimentos com radioisótopos e produtos químicos perigosos devem seguir a regulamentação e os procedimentos previstos na legislação nacional.
4. As secções «INTRODUÇÃO GERAL» e «COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER» devem ser lidas antes da utilização do presente ensaio para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas são descritas no apêndice 1.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

5. O ensaio de ligação ao hrER α mede a capacidade de um ligando com marcação radioativa – [³H]17 β -estradiol – para se ligar ao ER na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo (concorrente). Os produtos químicos em estudo que possuem uma elevada afinidade para o ER competem com o ligando com marcação radioativa a uma concentração mais baixa comparativamente com os produtos químicos com menor afinidade para o receptor.
6. O presente ensaio é composto por dois componentes principais: uma experiência de ligantes por saturação com vista a caracterizar os parâmetros da interação receptor-ligando, seguida de uma experiência de ligantes competitivos que caracteriza a concorrência entre um produto químico em estudo e um ligando com marcação radioativa para ligação ao ER.
7. O objetivo da experiência de ligação por saturação é caracterizar um determinado lote de receptores para afinidade de ligação e número de receptores em preparação para a realização da experiência de ligação competitiva. A experiência de ligação por saturação mede, em condições de equilíbrio, a afinidade de uma concentração fixa do receptor de estrogénio com o seu ligando natural (representado pela constante de dissociação, Kd) e a concentração de pontos de receptores ativos (B_{máx}).
8. A experiência de ligação competitiva mede a afinidade de uma substância para competir com o [³H]17 β -estradiol pela ligação ao ER. A afinidade é quantificada pela concentração do produto químico em estudo que, em equilíbrio, inibe 50 % do ligante específico do [³H]17 β -estradiol (designada «concentração inibidora 50 %» ou «IC₅₀»). A afinidade pode igualmente ser avaliada através da afinidade de ligação relativa (RBA, em relação à IC₅₀ do estradiol, medida separadamente na mesma série de ensaios). A experiência de ligação competitiva mede a ligação do [³H]17 β -estradiol a uma concentração fixa na presença de uma vasta gama de concentrações (oito ordens de grandeza) do produto químico em estudo. Os dados são, então, ajustados, na medida do possível, a uma forma da equação de Hill (Hill, 1910) que descreve o deslocamento do ligando radioativo através de um ligante concorrente num ponto. A extensão da deslocação do estradiol com marcação radioativa em equilíbrio é utilizada para caracterizar o produto químico em estudo como ligante, não ligante ou inconclusivo.

PROCEDIMENTO

Demonstração do desempenho proteico aceitável do hrER α

9. Antes de realizar rotineiramente os ensaios de ligação por saturação e de ligação competitiva, deve verificar-se se cada novo lote de hrER α tem um desempenho correto no laboratório em que será usado. Para demonstrar esse desempenho, deve utilizar-se um processo em duas etapas:
- Realização de um ensaio de ligação por saturação [^3H]17 β -estradiol para demonstrar a especificidade e a saturação do hrER α . A análise de regressão não linear dos dados (por exemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) e a subsequente aplicação da equação de Scatchard devem comprovar a afinidade de ligação do hrER α com o [^3H]17 β -estradiol (K_d) e o número de recetores ($B_{\text{máx}}$) de cada lote de hrER α .
 - Realizar um ensaio de ligação competitiva com recurso às substâncias de controlo [estrogénio de referência (17 β -estradiol)], um ligante fraco (por exemplo, noretinodrel ou noretindrona), e um não ligante (octiltrióxissilano, OTES). Cada laboratório deve estabelecer uma base de dados histórica para documentar a coerência do IC_{50} e outros valores relevantes para os estrogénios de referência e de um ligante fraco, entre as experiências e os diferentes lotes de hrER α . Os parâmetros das curvas de ligação competitiva para as substâncias de controlo devem situar-se dentro dos limites do intervalo de confiança de 95 % (ver quadro 1) que foram estabelecidos com recurso a dados de laboratórios que participaram no estudo de validação deste ensaio (2).

Quadro 1

CrITÉRIOS de desempenho estabelecidos para os estrogénios de referência e para o ligante fraco, ensaio de ligação de hrER de FW

Substância	Parâmetro	Média ^(a)	Desvio-padrão (n)	Intervalos de confiança de 95 % ^(b)	
				Limite inferior	Limite superior
17 β -Estradiol	Topo (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Base (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Curva de Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	log(IC ₅₀) (M)	-8,92 ^(c)	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Topo (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Base (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Curva de Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	log(IC ₅₀) (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindrona ^(c)	Topo (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Base (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Curva de Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	log(IC ₅₀) (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^(a) A média (n) \pm desvio-padrão (DP) foram calculados utilizando estimativas de parâmetros de ajustamento da curva (4 parâmetros da equação de Hill) para séries de ensaios de controlo realizadas em quatro laboratórios durante o estudo de validação (ver anexo N da referência bibliográfica 2).

^(b) Os intervalos de confiança de 95 % são fornecidos como orientação para os critérios de aceitabilidade.

^(c) O ensaio de noretindrona era facultativo para subtarefa 4 durante o estudo de validação (ver referência bibliográfica 2, ver «Subtarefa 4»). Por conseguinte, a média \pm DP (n) foi calculada utilizando estimativas ajustadas da curva (equação de 4 parâmetros de Hill) para séries de ensaios de controlo realizadas em dois laboratórios.

A gama do IC_{50} depende do K_d da preparação do recetor e da concentração de ligando com marcação radioativa utilizada em cada laboratório. Admite-se um ajustamento adequado da gama do IC_{50} com base nas condições de realização do ensaio.

Demonstração da competência técnica do laboratório

10. Ver os pontos 17 e 18 e o quadro 2 da secção «**COMPONENTES DA ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER**» do presente método de ensaio. Cada ensaio (ligação por saturação e ligação competitiva) deve ser constituído por três séries de ensaios independentes (ou seja, diluições de recetor, produtos químicos e reagentes) em dias diferentes, devendo cada série conter três replicados.

Determinação da concentração do recetor (hrERα)

11. A concentração do recetor ativo varia ligeiramente em função do lote e das condições de armazenagem. Por esta razão, deve determinar-se a concentração do recetor ativo recebida do fornecedor. Obtém-se assim a concentração adequada do recetor ativo no momento da série de ensaios.
12. Em condições correspondentes à ligação competitiva (1 nM [³H]-estradiol), as concentrações nominais de recetor de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 nM devem ser incubadas na ausência (ligação total) e na presença (ligação não específica) de 1 μM de estradiol não marcado. À ligação específica, calculada como a diferença entre a ligação total e a ligação não específica, faz-se corresponder a concentração nominal do recetor. A concentração do recetor que der valores de ligação específicos correspondentes a 20 % da marcação radioativa adicionada está relacionada com a concentração nominal de recetor correspondente, devendo esta ser utilizada para as experiências de saturação e de ligação competitiva. Frequentemente, uma concentração final de hrER de 0,5 nM satisfaz esta condição.
13. Se o critério dos 20 % não puder, repetidamente, ser satisfeito, importa verificar o procedimento experimental para deteção de eventuais erros. O incumprimento do critério dos 20 % pode indicar que há muito pouco recetor ativo no lote recombinante, caso em que se deve ponderar a utilização de outro lote de recetores.

Ensaio de saturação

14. Devem ser avaliadas em triplicado oito concentrações crescentes de [³H]17β-estradiol, nas três condições seguintes (ver quadro 2):
 - Ausência de 17β-estradiol não marcado e presença de ER. Trata-se de determinar a ligação total por medida da radioatividade nos poços que apenas têm [³H]17β-estradiol.
 - Presença de uma concentração excessiva (1 000 vezes mais) de β-estradiol não marcado em relação ao 17β-estradiol marcado e presença de ER. O objetivo desta condição é saturar os pontos de ligação ativos com 17β-estradiol não marcado e, mediante a medição da radioatividade nos poços, determinar a ligação não específica. Qualquer estradiol quente remanescente que possa ligar-se ao recetor é considerado ligante a um ponto não específico, dado que o estradiol frio deve estar numa concentração tão elevada que se liga a todos os pontos disponíveis no recetor.
 - Ausência de 17β-estradiol não marcado e ausência de ER (determinação da radioatividade total)

Preparação de soluções de [³H]17β-estradiol e de 17β-estradiol não marcado

15. As diluições de [³H]17β-estradiol devem ser preparadas por adição de tampão de ensaio a uma solução-mãe de [³H]17β-estradiol 12 nM para obter concentrações inicialmente compreendidas entre 0,12 nM e 12 nM. Adicionando 40 μl destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços (para um volume final de 160 μl), obtêm-se concentrações finais compreendidas entre 0,03 e 3,0 nM. A preparação do tampão de ensaio, da solução e diluições de [³H]17β-estradiol e a determinação das concentrações são descritas em pormenor no protocolo de FW (2).
16. As diluições de soluções de β-estradiol devem ser preparadas por adição de tampão de ensaio, a fim de se obter oito concentrações crescentes, compreendidas, inicialmente, entre 0,06 μM e 6 μM. Adicionando 80 μl destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços (para um volume final de 160 μl), obtêm-se as concentrações finais do ensaio, compreendidas entre 0,03 μM e 3 μM. A concentração final do 17β-estradiol não marcado nos poços individuais não específicos deve corresponder a 1 000 vezes a concentração do [3H]17β-estradiol não marcado. A preparação das diluições não marcadas de 17β-estradiol é descrita em pormenor no protocolo de FW (2).

17. Deve usar-se a concentração nominal do recetor que dê uma ligação específica de $20 \pm 5\%$ (ver os pontos 12 a 13). A solução de hrER α deve ser preparada imediatamente antes de ser utilizada.
18. As placas de microtitulação de 96 poços são preparadas de acordo com o quadro 2, com 3 replicados por concentração. O apêndice 2.2 apresenta exemplos de concentrações da placa e distribuição de volumes do [^3H]17 β -estradiol, 17 β -estradiol não marcado, tampão e recetor.

Quadro 2

Configuração da placa de microtitulação no ensaio de ligação por saturação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^3H] E2 + ER			0,06 nM [^3H] E2 + ER			0,08 nM [^3H] E2 + ER			0,10 nM [^3H] E2 + ER			Li-gante total (sol-vente)
B	0,30 nM [^3H] E2 + ER			0,60 nM [^3H] E2 + ER			1,0 nM [^3H] E2 + ER			3,0 nM [^3H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^3H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^3H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^3H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^3H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Li-gante não específico
E	0,30 nM [^3H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^3H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^3H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^3H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[^3H] E2: [^3H]17 β -estradiol

ER: recetor de estrogénio

E2: 17 β -estradiol não marcado

19. As placas de microtitulação devem ser incubadas a 2-8 $^{\circ}$ C, durante 16-20 horas, e colocadas num mecanismo de rotação durante o período de incubação.

Medição de [^3H]17 β -estradiol ligado à hrER α

20. O [^3H]17 β -estradiol ligado ao hrER α deve ser separado do [^3H]17 β -estradiol livre por adição de 80 μl de suspensão de DCC fria a cada poço, agitando as placas de microtitulação durante 10 minutos e centrifugando-as, durante 10 minutos, a cerca de 2 500 rpm. Para minimizar a dissociação de [^3H]17 β -estradiol ligado ao hrER α durante este processo, é extremamente importante que os tampões e os poços sejam mantidos a 2-8 $^{\circ}\text{C}$ e que cada etapa seja realizada rapidamente. Para utilizar as placas de microtitulação de forma eficiente e rápida, é necessário um agitador.
21. Para evitar qualquer contaminação dos poços por contacto com o DCC, devem retirar-se com extremo cuidado 50 μl do sobrenadante contendo [^3H]17 β -estradiol ligado ao hrER α .
22. Adicionam-se então a cada poço 200 μl de fluido de cintilação, capaz de converter a energia cinética das emissões nucleares em energia luminosa (A1-B12 e D1-E12). Os poços G1-H12 (identificados como dpms total) representam diluições sequenciais do [^3H]17 β -estradiol (40 μl), que devem ser adicionadas diretamente ao líquido de cintilação nos poços da placa de medição conforme indicado no quadro 3; assim, esses poços contêm apenas 200 μl de líquido de cintilação e a diluição adequada do [^3H]17 β -estradiol. Estas medidas demonstram quanto [^3H]17 β -estradiol foi adicionado a cada conjunto de poços para a ligação total e para a ligação não específica.

Quadro 3

Configuração da placa de microtitulação no ensaio de ligação por saturação Medição da radioatividade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E2 + ER			0,06 nM [³ H] E2 + ER			0,08 nM [³ H] E2 + ER			0,10 nM [³ H] E2 + ER			Li-gante total (solvente)
B	0,30 nM [³ H] E2 + ER			0,60 nM [³ H] E2 + ER			1,0 nM [³ H] E2 + ER			3,0 nM [³ H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [³ H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [³ H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [³ H] E2 + ER + 0,10 µM E2			Li-gante não específico
E	0,30 nM [³ H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [³ H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [³ H] E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [³ H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [³ H] E2 (dpms total)			0,06 nM [³ H] E2			0,08 nM [³ H] E2			0,10 nM [³ H] E2			Dpms total (*)
H	0,30 nM [³ H] E2			0,60 nM [³ H] E2			1,0 nM [³ H] E2			3,0 nM [³ H] E2			

[³H] E2: [³H]17β-estradiol

ER: recetor de estrogénio

E2: 17β-estradiol não marcado

Dpms: desintegrações por minuto

(*) As diluições sequenciais a quente de [³H]-estradiol marcado devem ser diretamente adicionadas em 200 µl de fluido de cintilação nos poços G1 – H12.

23. As medições devem iniciar-se com um desfasamento de, pelo menos, 2 horas, devendo o tempo de contagem ser de 40 minutos por poço. Para a determinação de dpm/poço, com correção do efeito de atenuação, deve utilizar-se um contador de cintilação em placas de microtitulação. Em alternativa, se não se dispuser de um contador de cintilação deste tipo, as amostras podem ser medidas num contador convencional. Nestas condições, pode ponderar-se uma redução do tempo de contagem.

Ensaio de ligação competitiva

24. O ensaio de ligação competitiva mede a ligação de uma única concentração de [³H]17β-estradiol na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo. Devem utilizar-se três replicados paralelos de cada concentração numa mesma série de ensaios. Além disso, devem efetuar-se três ensaios não paralelos para cada produto químico ensaiado. O ensaio deve utilizar uma ou mais placas de microtitulação de 96 poços.

Controlos

25. experiência do ensaio deve incluir o solvente e os controlos paralelos (isto é, estrogénios de referência, ligante fraco e não ligante). As curvas de concentração inteiras para os estrogénios e os controlos de referência (por exemplo, ligante fraco e não ligante) devem corresponder a uma única placa em cada série de ensaios. Todas as outras placas devem conter: i) uma concentração elevada (deslocamento máximo) e média (aproximadamente a IC₅₀) de cada um dos E2 e ligante fraco em triplicado; ii) controlo do solvente e ligação não específica, cada um, no mínimo, em triplicado. Os procedimentos para a preparação das soluções-tampão de ensaio, controlos, [³H]17β-estradiol, hrERα e produtos químicos em estudo estão descritos na referência bibliográfica 2 (anexo K, ver «FW Assay Protocol»).

Controlo do solvente

26. O controlo do solvente indica que este não interage com o sistema de ensaio e mede a ligação total (TB). O etanol é o solvente preferencial. Em alternativa, se a concentração mais elevada do produto químico em estudo não for solúvel em etanol, pode utilizar-se DMSO. A concentração de etanol – ou DMSO, se for o caso – nos poços do ensaio final é de 1,5 %, não podendo exceder 2 %.

Controlo do tampão

27. O controlo do tampão (BC) não deve conter solvente nem produto químico em estudo, mas conter todos os outros componentes do ensaio. Os resultados do controlo do tampão são comparados com o controlo do solvente, para verificar se o solvente utilizado não afeta o sistema de ensaio.

Ligante forte (estrogénio de referência)

28. O 17 β -estradiol (n.º CAS 50-28-2) é o ligando endógeno e liga-se com elevada afinidade ao ER de subtipo alfa. Deve preparar-se uma curva padrão com 17 β -estradiol não marcado para cada ensaio de ligação competitiva do hrER α , a fim de se proceder a uma avaliação da variabilidade entre ensaios realizados no mesmo laboratório. Devem preparar-se, em etanol, oito soluções de 17 β -estradiol não marcado, com concentrações nos poços compreendidas entre 100 nM e 10 pM (-7[logM] a -11[logM]), espaçadas do seguinte modo: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). A maior concentração de 17 β -estradiol (1 μ M) não marcado serve também de indicador de ligação inespecífica. Esta concentração distingue-se pelo rótulo «NSB» no quadro 4, embora também faça parte da curva-padrão.

Ligante fraco

29. Para demonstrar a sensibilidade de cada experiência e permitir uma avaliação da variabilidade ao longo do tempo, deve ser incluído um ligante fraco [noretinodrel (n.º CAS 68-23-5) ou noretinodrona (n.º CAS 68-22-4)]. Devem preparar-se, em etanol, oito soluções de ligante fraco, com concentrações nos poços compreendidas entre 3 nM e 30 μ M (-8,5[logM] to -4,5[logM]), espaçadas do seguinte modo: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Não ligante

30. Deve ser usado octiltriotoxissilano (OTES, n.º CAS 2 943-75-1) como controlo negativo (não ligante), que garante que o ensaio permite detetar os produtos químicos em estudo que não se ligam ao hrER α . Devem preparar-se em etanol oito soluções do não ligante, com concentrações nos poços do ensaio compreendidas entre 0,1 nM e 1 000 μ M (-10[logM] a -3[logM]) e escalonadas. Pode utilizar-se ftalato de di-*n*-butilo (DBP), como não ligante de controlo alternativo. A sua solubilidade máxima demonstrada é de -4 [logM].

Concentração de hrER α

31. Deve utilizar-se a quantidade de recetor que dá um valor específico de ligação de 20 \pm 5 % de 1 nM de ligando radioativo (ver pontos 12-13 do apêndice 2). A solução de hrER α deve ser preparada imediatamente antes de ser utilizada.

[³H]17 β -estradiol

32. A concentração de [³H]17 β -estradiol nos poços deve ser de 1,0 nM.

Produtos químicos em estudo

33. Em primeiro lugar, é necessário realizar um ensaio para determinar o limite de solubilidade de cada produto químico em estudo e identificar a gama de concentrações a utilizar na condução do protocolo de ensaio. O limite de solubilidade de cada produto químico em estudo no solvente deve ser objeto de determinação preliminar e confirmado em condições de ensaio. A concentração final estudada no ensaio não deve exceder 1 mM. O ensaio de determinação da gama inclui um controlo do solvente, juntamente com, pelo menos, 8 diluições sequenciais, com início na concentração máxima aceitável (por exemplo: 1 mM ou menos, com base no limite de solubilidade) e a presença de ligeira turbidez ou precipitado (ver também o ponto 35). O produto químico em estudo deve ser ensaiado utilizando curvas de intervalos de concentrações de 8 log, tal como definido no ensaio de determinação de gama anterior. As concentrações na segunda e na terceira experiência devem ser ajustadas na medida do necessário para caracterizar melhor a curva concentração-resposta.
34. As diluições do produto químico em estudo devem ser preparadas no solvente adequado (ver ponto 26 do apêndice 2). Se a concentração mais elevada do produto químico em estudo não for solúvel nem em etanol nem em DMSO e a introdução de um novo solvente implicar uma concentração de solvente no tubo final superior ao limite aceitável, a concentração mais elevada pode ser reduzida para a concentração imediatamente inferior. Neste caso, pode acrescentar-se uma concentração adicional na extremidade inferior da série de concentrações. As outras concentrações das séries devem permanecer inalteradas.

35. As soluções do produto químico em estudo devem ser monitorizadas de perto quando adicionadas ao poço de ensaio, uma vez que o produto químico em estudo precipitar para fora do poço. Os dados relativos a todos os poços que contenham precipitado não devem ser tidos em conta e os respetivos motivos de exclusão devem ser anotados.
36. Se houver informação prévia, de outras fontes, que forneça o $\log(IC_{50})$ de um produto químico em estudo, pode ser conveniente espaçar as diluições de forma geométrica, mais perto do $\log(IC_{50})$ esperado, ou seja, 0,5 unidades logarítmicas em torno do $\log(IC_{50})$ esperado. O resultado final deve refletir a extensão suficiente das concentrações para os dois lados do $\log(IC_{50})$, incluindo o «topo» e o «base», de modo a que a curva de ligação possa ser adequadamente caracterizada.

Organização da placa de ensaio

37. Devem preparar-se placas de microtitulação marcadas – tendo em conta as incubações sêxtuplas – com códigos para o controlo do solvente, a concentração mais elevada do estrogénio de referência (que serve igualmente como indicador de ligação não específica – NSB) e o controlo do tampão, tendo em mente as incubações triplas com códigos para cada uma das oito concentrações do controlo não ligante (octiltrióxissilano), as sete concentrações mais baixas do estrogénio de referência, as oito concentrações das doses do ligante fraco e as oito concentrações de cada produto químico em estudo (TC). No quadro 4 figura um exemplo do diagrama da placa para as curvas de concentração inteiras dos estrogénios de referência e do controlo. São utilizadas placas de microtitulação adicionais para os produtos químicos em estudo, placas essas que devem incluir controlos de placa, nomeadamente 1) uma concentração elevada (deslocamento máximo) e média (aproximadamente a IC_{50}) de cada um dos E2 e ligante fraco em triplicado; 2) controlo do solvente e ligação não específica, cada uma sextuplicada (quadro 5). O apêndice 2.3 apresenta um exemplo de folha de cálculo com um esquema de configuração das placas de microtitulação com três produtos químicos em estudo desconhecidos para o ensaio de ligação competitiva. As concentrações indicadas nos quadros 4 e 5 são as concentrações finais do ensaio. A concentração máxima para E2 deve ser 1×10^{-7} M; para o ligante fraco, deve ser usada a concentração mais elevada utilizada para o mesmo na placa 1. A concentração IC_{50} deve ser determinada pelo laboratório com base na sua base de dados históricos de controlo. Espera-se que esse valor seja semelhante ao observado nos estudos de validação (ver quadro 1).

Quadro 4

Configuração das placas de microtitulação do ensaio de ligação competitiva, curvas de concentração inteiras para o estrogénio e os controlos de referência (placa 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (apenas solvente)			TB (apenas solvente)			NSB			NSB		
B	$E2 (1 \times 10^{-7})$			$E2 (1 \times 10^{-8})$			$E2 (1 \times 10^{-8,5})$			$E2 (1 \times 10^{-9})$		
C	$E2 (1 \times 10^{-9,5})$			$E2 (1 \times 10^{-10})$			$E2 (1 \times 10^{-11})$			Branco (*)		
D	$NE (1 \times 10^{-4,5})$			$NE (1 \times 10^{-5})$			$NE (1 \times 10^{-5,5})$			$NE (1 \times 10^{-6})$		
E	$NE (1 \times 10^{-6,5})$			$NE (1 \times 10^{-7})$			$NE (1 \times 10^{-7,5})$			$NE (1 \times 10^{-8,5})$		
F	$OTES (1 \times 10^{-3})$			$OTES (1 \times 10^{-4})$			$OTES (1 \times 10^{-5})$			$OTES (1 \times 10^{-6})$		
G	$OTES (1 \times 10^{-7})$			$OTES (1 \times 10^{-8})$			$OTES (1 \times 10^{-9})$			$OTES (1 \times 10^{-10})$		
H	Vazio (para quente) (**)			Vazio (para quente) (**)			Tampão de controlo			Tampão de controlo		

Neste exemplo, o ligando fraco é o noretinodrel (NE)

(*) Vazio verdadeiro, poço não utilizado

(**) Vazio não utilizado durante a incubação, mas utilizado para confirmar a radioatividade total adicionada.

Quadro 5

Configuração das placas de microtitulação do ensaio de ligação competitiva, curvas de concentração para os produtos químicos em estudo e controlos da placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (apenas solvente)			TB (apenas solvente)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4.5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Neste exemplo, o ligando fraco é o noretinodrel (NE)

Realização do ensaio de ligação competitiva

38. Conforme se mostra no quadro 6, devem ser adicionados aos poços 80 μ l de solvente de controlo do estrogénio de referência, ligante fraco, não ligante e produtos químicos em estudo, preparados em tampão de ensaio. Em seguida, deve adicionar-se a cada poço 40 μ l de uma solução de 4 nM [3 H]17 β -estradiol. Após uma rotação delicada durante 10 a 15 minutos, entre 2 e 15 $^{\circ}$ C, adicionam-se 40 μ l da solução de hrER α . As placas de microtitulação do ensaio devem ser incubadas a uma temperatura de 2 a 8 $^{\circ}$ C, durante 16-20 horas, e colocadas num mecanismo de rotação durante o período de incubação.

Quadro 6

Quantidade de componentes de ensaio para o ensaio de ligação competitiva nos hrER, placas microtituladoras

Volume (μ l)	Componente
80	17 β -Estradiol não marcado, noretinodrel, OTES, produtos químicos em estudo, solvente ou solução-tampão
40	Solução de 4 nM [3 H]17 β -estradiol
40	Solução de hrER α com a concentração determinada
160	Volume total em cada poço

39. Deve proceder-se à quantificação do valor da ligação do [3 H]17 β -estradiol ao hrER α , após a separação do [3 H]17 β -estradiol ligado ao hrER α do [3 H]17 β -estradiol livre mediante a adição de 80 μ l de suspensão de DCC fria a cada poço, conforme descrito nos pontos 20 a 23, para o ensaio de ligações por saturação.
40. Os poços H1-6 [identificados como «vazio (para quente)» no quadro 4] representam os dpms do [3 H]17 β -estradiol marcado em 40 μ l. A alíquota de 40 μ l deve ser diretamente depositada no fluido de cintilação, nos poços H1-H6.

Critérios de aceitabilidade

Ensaio de ligação por saturação

41. A curva de ligação específica deve atingir um patamar elevado à medida em que forem sendo utilizadas concentrações crescentes de [³H]17β-estradiol, indicando saturação do hrERα com o ligando.
42. A ligação específica a 1 nM de [³H]17β-estradiol deve situar-se no intervalo aceitável, entre 15 % e 25 % da radioatividade total média medida adicionada entre séries de ensaios. São aceitáveis pequenos desvios a este intervalo, mas se as séries de ensaios se situarem permanentemente fora deste intervalo de variação, ou se uma série de ensaios estiver consideravelmente fora deste intervalo, a concentração de proteínas deve ser ajustada, repetindo-se o ensaio de saturação.
43. Os dados devem produzir um diagrama linear de Scatchard.
44. A ligação não específica não deve ser excessiva. O seu valor deve, normalmente, ser < 35 % da ligação total. No entanto, o rácio pode, ocasionalmente, ultrapassar este limite se for medido um dpm muito baixo para a concentração mais baixa de 17β-estradiol com marcação radioativa.

Ensaio de ligação competitiva

45. O aumento das concentrações do 17β-estradiol não marcado deve deslocar o [³H]17β-estradiol do recetor de forma compatível com uma ligação competitiva num ponto.
46. O valor de IC₅₀ para o estrogénio de referência (17β-estradiol) deve ser aproximadamente igual à concentração molar de [³H]17β-estradiol mais o K_d determinado a partir do ensaio de saturação da ligação.
47. Nas séries de ensaios, a ligação específica total deve estar sistematicamente dentro de um intervalo aceitável de 20±5 % se a concentração média de radioatividade total medida adicionada a cada poço for de 1 nM. São aceitáveis pequenos desvios, mas, se as séries de ensaios se situarem permanentemente fora deste intervalo de variação, ou se uma série de ensaios se situar consideravelmente fora do mesmo, a concentração de proteínas deve ser ajustada.
48. O solvente não deve alterar a sensibilidade ou a reprodutibilidade do ensaio. Os resultados do controlo do solvente (poços de TB) são comparados com o controlo de tampão, a fim de verificar se o solvente utilizado não afeta o sistema de ensaio. Os resultados do TB e do controlo da solução-tampão devem ser comparáveis se não houver nenhum efeito do solvente no ensaio.
49. O não ligante não deve deslocar mais de 25 % do [³H]17β-estradiol do hrERα quando ensaiado a até 10⁻³ M (OTES) ou 10⁻⁴ M (DBP).
50. Foram estabelecidos critérios de desempenho para os estrogénios de referência e dois ligantes fracos (noretinodrel, noretindrona), com base nos dados do estudo de validação do ensaio de ligação FW hrER FW (anexo N da referência 2). Estão previstos intervalos de confiança de 95 % para DPDP (n) ±DPDP médio em todos os controlos em todos os laboratórios que participam no estudo de validação. Foram calculados intervalos de confiança de 95 % para os parâmetros de ajustamento da curva [ou seja, topo, base, curva de Hill, log(IC₅₀)]logIC₅₀ para os estrogénios de referência e ligantes fracos, e para o log₁₀(RBA)log₁₀RBA com base nos estrogénios de referência e são fornecidos como critérios de desempenho para os controlos positivos. O quadro 1 apresenta os intervalos previstos para os parâmetros de ajustamento da curva que podem ser utilizados como critérios de desempenho. Na prática, o intervalo de variação do IC₅₀ pode variar ligeiramente com base no K_d da preparação do recetor e na concentração do ligando.

51. Não foram definidos critérios de desempenho para os parâmetros de ajustamento da curva em relação aos produtos químicos em estudo, devido à grande variedade de produtos químicos em estudo existentes e à variação das principais afinidades e dos resultados (p. ex., curva inteira, curva parcial, sem ajustamento de curva). Contudo, devem ser utilizados critérios profissionais aquando da avaliação dos resultados de cada série de ensaios para um produto químico em estudo. Deve utilizar-se uma gama de concentrações do produto suficiente para definir claramente o topo (por exemplo, 90-100 % de ligação) da curva de ligação competitiva. A variabilidade dos replicados para cada concentração do produto químico em estudo, bem como entre as 3 séries não paralelas, deve ser razoável e cientificamente aceitável. Os controlos de cada série de ensaios em relação a um produto químico em estudo devem aproximar-se das medições de desempenho comunicadas para este ensaio do FW e ser coerentes com os dados históricos de controlo de cada laboratório.

ANÁLISE DOS DADOS

Ensaio de ligação por saturação

52. São medidas as ligações totais e as ligações não específicas. A partir destes valores, a ligação específica de concentrações crescentes de [³H]17β-estradiol em condições de equilíbrio é calculada subtraindo-se a ligação não específica do total. Um gráfico que apresente a ligação específica *versus* a concentração de [³H]17β-estradiol deve atingir um plano para o indicativo máximo específico da ligação por saturação do hrERα [³H-17H]β-estradiol. Além disso, a análise dos dados deve documentar a ligação do [³H]17β-estradiol a um único ponto de ligação de alta afinidade. As ligações não específicas, totais e específicas devem ser visíveis numa curva de ligação por saturação. Uma análise mais aprofundada destes dados deve utilizar uma análise de regressão não linear (ex., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) com uma apresentação final dos dados de acordo com Scatchard.
53. A análise de dados deve determinar a $B_{\text{máx}}$ e K_d a partir, unicamente dos dados relativos à ligação total, partindo do pressuposto de que a ligação não específica é de linear, salvo se for justificada a utilização de outro método. Ao determinar a melhor adequação, importa efetuar uma regressão sólida, salvo justificação. Deve indicar-se o método escolhido para uma regressão sólida. A correção da depleção de ligando (por exemplo, utilizando o método de Swillens 1995) deve ser sempre utilizada na determinação de $B_{\text{máx}}$ e K_d a partir dos dados da ligação por saturação.

Ensaio de ligação competitiva

54. A curva de ligação competitiva é representada como a ligação específica do [³H]17β-estradiol *versus* a concentração (log 10 unidades) do concorrente. A concentração do produto químico em estudo que inibe 50 % da ligação máxima específica do [³H]17β-estradiol é IC_{50} .
55. As estimativas de $\log(IC_{50})$ para os controlos positivos (por exemplo, estrogénios de referência e ligantes fracos) devem ser determinadas com recurso a um *software* de ajustamento não linear de ajustamento adequado, a fim de se adaptar à equação de quatro parâmetros de Hill (p. ex., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Em geral, o topo, a base, a curva e o $\log(IC_{50})$ devem ser mantidos inalterados quando se ajustam as curvas. Quando se determinar a melhor adequação, deve utilizar-se uma regressão sólida, a menos que seja apresentada uma justificação. Não devem ser feitas correções para a depleção do ligando. Após a análise inicial, cada curva de ligação deve ser avaliada de modo a garantir a devida adequação ao modelo. A afinidade de ligação relativa (RBA) do ligando fraco deve ser calculada como percentagem do $\log(IC_{50})$ para o ligante fraco em relação ao $\log(IC_{50})$ para o 17β-estradiol. Os resultados dos controlos positivos e do controlo não ligante devem ser avaliados de acordo com as medidas do desempenho do ensaio constantes dos pontos 45 a 50 do presente apêndice 2.
56. Os dados relativos a todos os produtos químicos em estudo devem ser analisados através de uma abordagem por etapas, para garantir que os dados são devidamente analisados e que cada ligação competitiva é devidamente classificada. Recomenda-se que cada série de ensaios para um produto químico em estudo seja inicialmente submetida a uma análise normalizada de dados idêntica à utilizada para os estrogénios de referência e para controlos de ligantes fracos (ponto 55). Uma vez concluída, deve ser efetuada uma avaliação técnica dos parâmetros de ajustamento da curva, bem como uma análise visual do grau de adequação dos dados à curva de ligação competitiva gerada para cada série de ensaios. Durante esta avaliação técnica, as observações de uma diminuição dependente da concentração do [³H]17β-estradiol especificamente ligado, da baixa variabilidade entre os replicados técnicos em cada concentração do produto químico em estudo e da coerência dos parâmetros de ajustamento entre as três séries de ensaios constituem uma boa indicação de que a análise de ensaios e de dados foi realizada de forma adequada.

Interpretação dos dados

57. Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado um ligante para o hrERA se for possível ajustar uma curva ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for inferior a 50 % (figura 1).
58. O produto químico em estudo é considerado como não ligante se, cumpridos todos os critérios de aceitabilidade:
- for possível ajustar uma curva de ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for superior a 75 %, ou
 - não for possível ajustar uma curva de ligação e a média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração dos dados for superior a 75 %.
59. Os produtos químicos em estudo são considerados equívocos se nenhuma das condições acima referidas estiver preenchida (por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

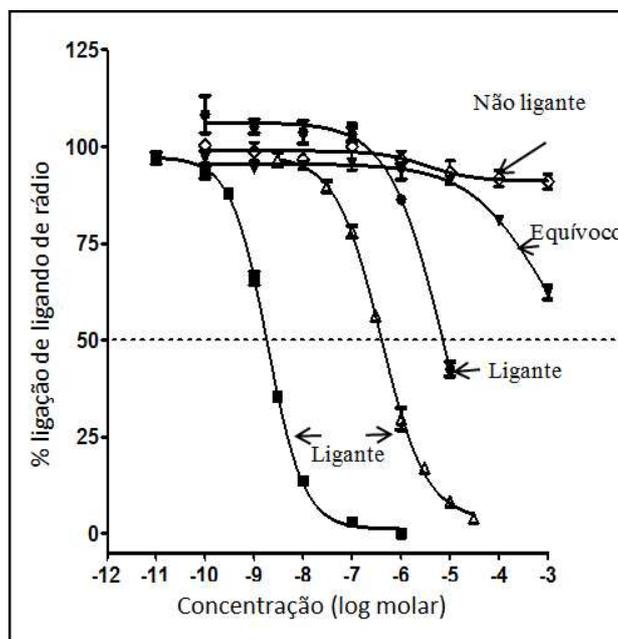
Quadro 7

Critérios para classificação com base numa curva de ligação competitiva para um produto químico em estudo

Classificação	Critérios
Ligante ^a	Uma curva de ligação pode ser ajustada. O ponto mais baixo na curva de resposta dentro da gama de dados é inferior a 50 % .
Não ligante ^b	Se for possível ajustar a curva de ligação, o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados é superior a 75 % . Se não for possível ajustar a curva de ligação, a média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração nos dados é superior a 75 % .
Inconclusivo ^c	Qualquer produto químico em estudo que não seja ligante nem não ligante. (Por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

Figura 1

Exemplos de classificação de produtos químicos em estudo por meio de uma curva de ligação competitiva



60. As várias séries de ensaios realizados num laboratório para um produto químico em estudo são combinadas através da atribuição de valores numéricos a cada série de ensaios e fazendo a média das diferentes séries, como se indica no quadro 8. Os resultados para as séries combinadas em cada laboratório são comparados com a classificação prevista para cada produto químico em estudo.

Quadro 8

Método de classificação do produto químico em estudo utilizando múltiplas séries de ensaios

Para atribuir valor a cada série de ensaios	
Classificação	Valor numérico
Ligante	2
Inconclusivo	1
Não ligante	0

Para classificar a média dos valores numéricos das diferentes séries de ensaios	
Classificação	Valor numérico
Ligante	Média $\geq 1,5$
Inconclusivo	$0,5 \leq \text{média} < 1,5$
Não ligante	Média $< 0,5$

RELATÓRIO DO ENSAIO

61. Ver ponto 24 da secção «COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER»

Apêndice 2.1

LISTA DE TERMOS

DCC: carvão revestido com dextrose.

[³H]E2: 17β-estradiol com marcação radioativa por trítio.

E2: 17β-estradiol não marcado (inerte).

hrERα: recetor alfa de estrogénio recombinante humano.

Replicado: um ou vários poços que contêm o mesmo conteúdo com as mesmas concentrações e que são objeto de ensaios paralelos numa única série de ensaios. Neste protocolo, cada concentração do produto químico em estudo é ensaiada em triplicado; isto é, existem três replicados que são ensaiados simultaneamente em cada concentração do produtos químicos em estudo.

Série de ensaios: conjunto completo de poços de placas de microtitulação que fornece todas as informações necessárias para caracterizar a ligação de um produto químico em estudo ao hrERα (viz., total [³H]17β-estradiol adicionado ao poço, ligação máxima do [³H]17β-estradiol ao hrERα ligação não específica e ligação total em diferentes concentrações do produto químico em estudo). Uma série de ensaio pode consistir em apenas um poço bem (ou seja, replicado) por concentração; contudo, dado que este protocolo requer que os ensaios sejam realizados em triplicado, uma série de ensaios consiste em três poços por concentração. Além disso, este protocolo requer três séries de ensaio independentes (ou seja, não paralelas) por produto químico.

Tampão de ensaio: 10 mM Tris, 10 mg de albumina de soro bovino/ml, 2 mM TDT, 10 % de glicerol, 0,2 mM leupeptina, pH 7,5.

Apêndice 2.2

ENSAIO DE SATURAÇÃO TÍPICA DO [³H]17β-ESTRADIOL COM TRÊS POÇOS REPLICADOS

Ensaio de saturação típica do [³ H]17β-estradiol com três poços replicados											
Posição	Replicado	Código do tipo do poço	Concentração inicial a quente de E2 (nM)	Volume a quente do E2 (μl)	Concentração final a quente do E2 (nM)	Concentração inicial a frio do E2 (μM)	Volume a frio do E2 (μl)	Concentração final a frio do E2 (μM)	Volume do tampão (μl)	Volume do recetor (μl)	Volume total em poços
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Ensaio de saturação típica do [³H]17β-estradiol com três poços replicados

Posição	Replicado	Código do tipo do poço	Concentração inicial a quente de E2 (nM)	Volume a quente do E2 (µl)	Concentração final a quente do E2 (nM)	Concentração inicial a frio do E2 (µM)	Volume a frio do E2 (µl)	Concentração final a frio do E2 (µM)	Volume do tampão (µl)	Volume do receptor (µl)	Volume total em poços
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Ensaio de saturação típica do [³H]17β-estradiol com três poços replicados

Posição	Replicado	Código do tipo do poço	Concentração inicial a quente de E2 (nM)	Volume a quente do E2 (µl)	Concentração final a quente do E2 (nM)	Concentração inicial a frio do E2 (µM)	Volume a frio do E2 (µl)	Concentração final a frio do E2 (µM)	Volume do tampão (µl)	Volume do receptor (µl)	Volume total em poços
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Quente	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Quente	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Quente	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Quente	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Quente	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Quente	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Quente	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Quente	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Quente	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Quente	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Quente	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Quente	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Quente	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Quente	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Quente	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Quente	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Ensaio de saturação típica do [³H]17β-estradiol com três poços replicados

Posição	Replicado	Código do tipo do poço	Concentração inicial a quente de E2 (nM)	Volume a quente do E2 (µl)	Concentração final a quente do E2 (nM)	Concentração inicial a frio do E2 (µM)	Volume a frio do E2 (µl)	Concentração final a frio do E2 (µM)	Volume do tampão (µl)	Volume do recetor (µl)	Volume total em poços
H5	2	Quente	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Quente	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Quente	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Quente	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Quente	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Quente	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Quente	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Quente	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Note-se que os poços «quentes» estão vazios durante a incubação. Os 40 µl são adicionados apenas para contagem de cintilação.

Apêndice 2.3

CONFIGURAÇÃO DO ENSAIO DE LIGAÇÃO COMPETITIVA

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (μ l)	Volume do tampão (μ l)	Volume (μ l) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (μ l)	Volume final (μ l)	Concentração final concorrente (M)
S	A1	1	Ligação total	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	Ligação total	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	Ligação total	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	Ligação total	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	Ligação total	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	Ligação total	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	E2 frio	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	E2 frio	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	E2 frio	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	E2 frio	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	E2 frio	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	E2 frio	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	E2 frio	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	E2 frio	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	E2 frio	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	B10	1	E2 frio	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	E2 frio	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	E2 frio	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	E2 frio	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	E2 frio	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	E2 frio	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	E2 frio	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	E2 frio	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	E2 frio	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	E2 frio	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	E2 frio	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	E2 frio	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	Vazio	Vazio	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	Vazio	Vazio	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	Vazio	Vazio	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	D7	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	—	40	80	160	3,0E-09

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	E11	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Note-se que os poços «quentes» estão vazios durante a incubação. Os 40 µl são adicionados apenas para contagem de cintilação.

Configuração do ensaio de ligação competitiva

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (μ l)	Volume de tampões (μ l)	Volume (μ l) do traçador (E2 quente)	Volume da placa de diluição (μ l)	Volume final (μ l)	Concentração final do concorrente (M)
P1	A1	1	Ligação total	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	Ligação total	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	Ligação total	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	Ligação total	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	Ligação total	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	Ligação total	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Produto químico em estudo 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Produto químico em estudo 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Produto químico em estudo 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Produto químico em estudo 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Produto químico em estudo 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Produto químico em estudo 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Produto químico em estudo 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Produto químico em estudo 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Produto químico em estudo 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Produto químico em estudo 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Produto químico em estudo 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Produto químico em estudo 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Configuração do ensaio de ligação competitiva

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume de tampões (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	C1	1	Produto químico em estudo 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Produto químico em estudo 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Produto químico em estudo 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Produto químico em estudo 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Produto químico em estudo 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Produto químico em estudo 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Produto químico em estudo 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Produto químico em estudo 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Produto químico em estudo 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Produto químico em estudo 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Produto químico em estudo 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Produto químico em estudo 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Produto químico em estudo 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Produto químico em estudo 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Produto químico em estudo 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Produto químico em estudo 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Produto químico em estudo 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Produto químico em estudo 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Produto químico em estudo 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Produto químico em estudo 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Produto químico em estudo 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Produto químico em estudo 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Produto químico em estudo 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Produto químico em estudo 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Configuração do ensaio de ligação competitiva

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	VOLUME de tampões (µl)	VOLUME (µl) do traçador (E2 quente)	VOLUME da placa de diluição (µl)	VOLUME final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	E1	1	Produto químico em estudo 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Produto químico em estudo 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Produto químico em estudo 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Produto químico em estudo 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Produto químico em estudo 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Produto químico em estudo 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Produto químico em estudo 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Produto químico em estudo 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Produto químico em estudo 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Produto químico em estudo 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Produto químico em estudo 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Produto químico em estudo 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Produto químico em estudo 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Produto químico em estudo 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Produto químico em estudo 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Produto químico em estudo 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Produto químico em estudo 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Produto químico em estudo 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Produto químico em estudo 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Produto químico em estudo 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Produto químico em estudo 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Produto químico em estudo 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Produto químico em estudo 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Produto químico em estudo 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Configuração do ensaio de ligação competitiva

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume de tampões (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	G1	1	Produto químico em estudo	3 TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Produto químico em estudo	3 TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Produto químico em estudo	3 TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Produto químico em estudo	3 TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Produto químico em estudo	3 TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Produto químico em estudo	3 TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Produto químico em estudo	3 TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Produto químico em estudo	3 TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Produto químico em estudo	3 TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Produto químico em estudo	3 TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Produto químico em estudo	3 TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Produto químico em estudo	3 TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	Noretinodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretinodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretinodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 S frio			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 S frio			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 S frio			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 S frio			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 S frio			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 S frio			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Apêndice 3

ENSAIO *IN VITRO* DO LIGAÇÃO AO RECTOR DO ESTROGÉNIO COM RECURSO A UMA PROTEÍNA DE DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DO LIGANDO ER α RECOMBINANTE HUMANA DO CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. Este ensaio *in vitro* de ligação por saturação e competitiva ao receptor estrogénico utiliza um domínio de ligação do ligando (LBD) do ER α humano (hrER α). Este modelo de proteína foi produzido pelo Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), no Japão, existe como proteína de fusão da glutathione-S-transferase (GST) e é expressa em *Escherichia coli*. O protocolo CERI foi objeto de um estudo internacional de validação em vários laboratórios (2) que demonstrou a sua adequação e fiabilidade para o fim a que se destina o ensaio.
2. Este ensaio é um procedimento de análise para identificação de substâncias suscetíveis de se ligar ao hrER α . É utilizado para determinar a capacidade de um produto químico em estudo para competir com o 17 β -estradiol pela ligação ao hrER α -LBD. Os resultados quantitativos do ensaio podem incluir o IC₅₀ (uma medição da concentração do produto químico em estudo necessária para deslocar metade do [³H]17 β -estradiol do hrER α) e as afinidades de ligação relativas dos produtos químicos em estudo para o hrER α em comparação com o 17 β -estradiol. Para fins de análise química, os resultados qualitativos de ensaios aceitáveis podem incluir classificações produtos químicos em estudo como ligantes ou não ligantes do hrER α , ou como inconclusivos com base nos critérios descritos para as curvas de ligação.
3. O ensaio utiliza ligandos radioativos que requerem que o laboratório possua uma licença para materiais radioativos. Todos os procedimentos com radioisótopos e produtos químicos perigosos devem seguir a regulamentação e os procedimentos previstos na legislação nacional.
4. As secções «INTRODUÇÃO GERAL» e «COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER» devem ser lidas antes de o presente ensaio ser utilizado para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice 1.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

5. O ensaio de ligação ao hrER α mede a capacidade de um ligando com marcação radioativa ([³H]17 β -estradiol) para se ligar com o ER na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo (concorrente). Os produtos químicos em estudo que possuem uma elevada afinidade para o ER competem com o ligando com marcação radioativa a uma concentração mais baixa comparativamente com os produtos químicos com menor afinidade para o receptor.
6. O presente ensaio é composto por dois componentes principais: uma experiência de ligantes por saturação com vista a caracterizar os parâmetros da interação receptor-ligando, seguida de uma experiência de ligantes competitivos que caracteriza a concorrência entre um produto químico em estudo e um ligando com marcação radioativa para ligação ao ER.
7. O objetivo da experiência de ligação por saturação é caracterizar um determinado lote de receptores relativamente à sua afinidade de ligação e número de receptores em preparação para a realização da experiência de ligação competitiva. A experiência de ligação por saturação mede, em condições de equilíbrio, a afinidade de uma concentração fixa do receptor de estrogénio com o seu ligando natural (representado pela constante de dissociação, K_d) e a concentração de pontos de receptores ativos (B_{máx}).
8. A experiência de ligação competitiva mede a afinidade de uma substância para competir com o ([³H]17 β -estradiol) pela ligação ao ER. A afinidade é quantificada pela concentração do produto químico em estudo que, em equilíbrio, inibe 50 % do ligante específico do ([³H]17 β -estradiol (designada «concentração inibidora 50 %» ou «IC₅₀»). A afinidade pode igualmente ser avaliada através da afinidade de ligação relativa (RBA, em relação à IC₅₀ do estradiol, medida separadamente na mesma série de ensaios). A experiência de ligação competitiva mede a ligação do ([³H]17 β -estradiol) a uma concentração fixa na presença de uma vasta gama de concentrações (oito ordens de grandeza) do produto químico em estudo. Os dados são, então, ajustados, na medida do possível, a uma forma da equação de Hill (Hill, 1910) que descreve o deslocamento do ligando radioativo através de um ligante concorrente num ponto. A extensão do deslocamento do estradiol com marcação radioativa em equilíbrio é utilizada para caracterizar o produto químico em estudo como ligante, não ligante ou inconclusivo.

PROCEDIMENTO

Demonstração do desempenho proteico aceitável do hrER α

9. Antes de realizar rotineiramente os ensaios de ligação por saturação e de ligação competitiva, deve verificar-se se cada novo lote de hrER α tem um desempenho correto no laboratório em que será usado. Para demonstrar esse desempenho, deve ser utilizado um processo em duas etapas:
- Realização de um ensaio de ligação por saturação [^3H]17 β -estradiol para demonstrar a especificidade e a saturação do hrER α . A análise de regressão não linear de tais dados (por exemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) e a subsequente equação de Scatchard devem documentar a afinidade de ligação do hrER α com o [^3H]17 β -estradiol (Kd) e o número de recetores ($B_{\text{máx}}$) de cada lote de hrER α .
 - Realizar um ensaio de ligação competitiva com recurso às substâncias de controlo [estrogénio de referência (17 β -estradiol)], um ligante fraco (por exemplo, noretinodrel ou noretindrona), e um não ligante (octiltriotoxissilano, OTES). Cada laboratório deve estabelecer uma base de dados histórica para documentar a coerência do IC₅₀ e os valores relevantes para os estrogénios de referência e de um ligante fraco entre as experiências e os diferentes lotes de hrER α . Além disso, os parâmetros das curvas de ligação competitiva para as substâncias de controlo devem situar-se dentro dos limites do intervalo de confiança de 95 % (ver quadro 1) que foram desenvolvidos com recurso a dados de laboratórios que participaram no estudo de validação deste ensaio (2).

Quadro 1

Crítérios de desempenho desenvolvidos para os estrogénios de referência e para o ligante fraco, ensaio de ligação de hrER do CERI

Substância	Parâmetro	Média (°):	Desvio-padrão (n)	Intervalos de confiança de 95 % (°)	
				Limite inferior	Limite superior
17 β -estradiol	Topo	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Base	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Curva de Hill	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	log(IC ₅₀)	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretinodrel	Topo	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Base	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Curva de Hill	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	log(IC ₅₀)	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindrona (°)	Topo	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Base	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Curva de Hill	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	log(IC ₅₀)	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

(°) O desvio-padrão médio com (dimensão da amostra n) foi calculado utilizando estimativas ajustadas da curva (equação de 4 dos parâmetros de Hill) para séries de ensaios de controlo realizados em quatro laboratórios durante o estudo de validação (ver anexo N da referência 2).

(°) A confiança de 95 % é fornecida como orientação para os critérios de aceitabilidade.

(°) O ensaio de noretindrona era facultativo para a sub tarefa 4 durante o estudo de validação (ver referência bibliográfica 2, ver sub tarefa 4). Por conseguinte, a média \pm DP (n) foi calculada utilizando estimativas ajustadas da curva (equação de 4 parâmetros de Hill) para séries de ensaios de controlo realizadas em dois laboratórios.

A gama do IC₅₀ depende do Kd da preparação do recetor e da concentração de ligando com marcação radioativa utilizada em cada laboratório. Admite-se um ajustamento adequado da gama do IC₅₀ com base nas condições de realização do ensaio.

Demonstração da competência técnica do laboratório

- Os pontos 17 e 18 e o quadro 2 da secção «**COMPONENTES DA ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER**» do presente método de ensaio. Cada ensaio (ligação por saturação e ligação competitiva) deve ser constituído por três séries de ensaios independentes (ou seja, diluições de recetor, produtos químicos e reagentes) em dias diferentes, devendo cada série conter três replicados.

Determinação do da concentração do recetor (hrER α)

- A concentração do recetor ativo varia ligeiramente em função do lote e das condições de armazenagem. Por esta razão, deve determinar-se a concentração do recetor ativo recebida do fornecedor. Obtém-se, assim, a concentração adequada do recetor ativo no momento da série de ensaios.
- Em condições correspondentes à ligação competitiva (0,5 nM [^3H]-estradiol), as concentrações nominais de recetor de 0,1, 0,2, 0,4 e 1 nM devem ser incubadas na ausência (ligação total) e na presença (ligação não específica) de 1 μM de estradiol não marcado. À ligação específica, calculada como a diferença entre a ligação total e a ligação inespecífica, faz-se corresponder a concentração nominal do recetor. A concentração do recetor que der valores de ligação específicos correspondentes a 40 % da marcação radioativa adicionada está relacionada com a concentração de recetor correspondente, devendo esta concentração ser utilizada para as experiências de saturação e de ligação competitiva. Frequentemente, uma concentração final de hrER de 0,2 nM satisfaz esta condição.
- Se o critério dos 40 % não puder, repetidamente, ser satisfeito, o procedimento experimental deve ser verificado para deteção de eventuais erros. O incumprimento do critério dos 40 % pode indicar que há muito pouco recetor ativo no lote recombinante, caso em que deve ser considerada a utilização de outro lote de recetores.

Ensaio de saturação

- Devem ser avaliadas em triplicado oito concentrações crescentes de [^3H]17 β -estradiol, nas três condições seguintes (ver quadro 2):
 - Ausência de 17 β -estradiol não marcado e presença de ER. Esta é a determinação da ligação total por medida da radioatividade nos poços que apenas têm 0,5 nM [^3H]17 β -estradiol.
 - Presença de uma concentração excessiva (2000 vezes superior) de 17 β -estradiol não marcado em relação ao 17 β -estradiol marcado e presença de ER. O objetivo desta condição é saturar os pontos de ligação ativos com 17 β -estradiol não marcado e, mediante a medição da radioatividade nos poços, determinar a ligação não específica. Qualquer estradiol quente remanescente que possa ligar-se ao recetor é considerado ligante a um ponto não específico, dado que o estradiol frio deve estar numa concentração tão elevada que se liga a todos os pontos disponíveis no recetor.
 - Ausência de 17 β -estradiol não marcado e ausência de ER (determinação da radioatividade total)

Preparação de soluções de [^3H]17 β -estradiol, de 17 β -estradiol não marcado e de hrER α

- Deve preparar-se uma solução de 40 nM de [^3H]17 β -estradiol a partir de uma solução de 1 μM de [^3H]17 β -estradiol em DMSO, adicionando DMSO (para preparar 200 nM) e tampão à temperatura ambiente (para preparar 40 nM). Usando esta solução de 40 nM, a série de diluições preparadas do [^3H]17 β -estradiol, que variam entre 0,313 nM e 40 nM, com tampão de ensaio à temperatura ambiente (conforme representado na coluna 12 do quadro 2). As concentrações finais do ensaio, de 0,0313 a 4,0 nM, serão obtidas mediante a adição de 10 μl destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços (ver quadros 2 e 3). A preparação do tampão de ensaio, cálculo da solução original do [^3H]17 β -estradiol baseada na sua atividade específica, a preparação de diluições e a determinação das concentrações estão descritas em pormenor no protocolo de CERI (2).

16. As diluições de soluções de 17 β -estradiol devem ser preparadas a partir de uma solução de 1 nM 17 β -estradiol por adição de tampão de ensaio, a fim de se obter oito concentrações crescentes, compreendidas, inicialmente, entre 0,625 μ M e 80 μ M. As concentrações finais do ensaio, de 0,0625 to 8 nM, serão obtidas mediante a adição de 10 μ l destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços específica para a medição da ligação não específica (ver quadros 2 e 3). A preparação das diluições não marcadas de 17 β -estradiol é descrita em pormenor no protocolo do CERI (2).
17. Deve usar-se a concentração do recetor que dê uma ligação específica de 40 \pm 10 % (ver os pontos 12 e 13). A solução de hrER α deve ser preparada com tampão de ensaio gelado imediatamente antes do uso, ou seja, depois de terem sido preparados todos os poços para ligação total, ligação não específica e ligados.
18. As placas de microtitulação de 96 poços são preparadas de acordo com o quadro 2, com 3 replicados por concentração de [3 H]17 β -estradiol. O quadro 3 apresenta exemplos da distribuição de volumes do [3 H]17 β -estradiol, 17 β -estradiol não marcado, tampão e recetor.

Quadro 2

Configuração da placa de microtitulação no ensaio de ligação por saturação

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Para medição de TB			Para medição de NSB			Apenas para determinação do ligando quente			/	Diluições de E2 não rotuladas para as colunas de placas 4-6	Diluições de [3 H]E2 para as colunas de placas 1-9
A	0,0313 nM [3 H] E2+ ER			0,0313 nM [3 H] E2+ 0,0625 μ M E2+ ER			0,0313 nM			/	0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [3 H] E2+ ER			0,0625 nM [3 H] E2+ 0,125 μ M E2+ ER			0,0625 nM			/	1,25 μ M	0,625 nM
C	30,125 nM [3 H] E2+ ER			0,125 nM [3 H] E2+ 0,25 μ M E2+ ER			0,125 nM			/	2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [3 H] E2+ ER			0,250 nM [3 H] E2+ 0,5 μ M E2+ ER			0,250 nM			/	5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [3 H] E2+ ER			0,50 nM [3 H] E2+ 1 μ M E2+ ER			0,50 nM			/	10 μ M	5 nM
F	1,00 nM [3 H] E2+ ER			1,00 nM [3 H] E2+ 2 μ M E2+ ER			1,00 nM			/	20 μ M	10 nM
G	2,00 nM [3 H] E2+ ER			2,00 nM [3 H] E2+ 4 μ M E2+ ER			2,00 nM			/	40 μ M	20 nM
H	4,00 nM [3 H] E2+ ER			4,00 nM [3 H] E2+ 8 μ M E2+ ER			4,00 nM			/	80 μ M	40 nM

TB: ligação total

NSB: ligação não específica

[3 H] E2: [3 H]17 β -estradiolE2: 17 β -estradiol não marcado

(*) As concentrações indicadas neste caso são as concentrações finais em cada poço.

(**) As diluições de E2 e [3 H]E2 não marcados podem ser preparadas numa placa diferente.

Quadro 3

Volumen de reagente para a placa de microtitulação para saturação

Número da coluna		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Etapas de preparação		Poços TB			Poços NSB			Apenas ligando		
Volume dos componentes para os poços de reação acima e ordem de adição	Tampão	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 não marcado da coluna 11 do quadro 2	—			10 µl			—		
	[3H] E2 da coluna 12 do quadro 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Volume total de reação		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubação		REAÇÃO APÓS 2 HORAS DE INCUBAÇÃO						Quantificação da radioatividade imediatamente após a preparação. Sem incubação		
Tratamento com 0,4 % DCC		Sim			Sim			N.º		
Volume de 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtração		Sim			Sim			N.º		
MEDIÇÃO DO DPMS										
Quantificação do volume adicionado ao cocktail de cintilação		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Se um LSC para microplacas for utilizado para medição de dpms, não é adequado preparar o ligando quente isolado na mesma placa de ensaio dos poços de TB e NSB. O ligando quente isolado deve ser preparado numa placa diferente.

(**) Se a centrifugação for utilizada para separar o DCC, 50 µl do sobrenadante devem ser medidos pelo LSC, a fim de evitar a contaminação do DCC.

19. As placas de microtitulação para determinação da ligação total e não específicas devem ser incubadas à temperatura ambiente (22 °C a 28 °C) durante duas horas.

Medição da ligação do [3H]17β-estradiol à hrERα

20. Após o período de incubação de duas horas o [3H]17β-estradiol ligado ao hrERα deve ser separada do [3H]17β-estradiol livre pela adição de 100 µl de uma suspensão em gelo frio de 0,4 % DCC aos poços. As placas devem então ser colocadas em gelo durante 10 minutos, devendo a mistura de reação e a suspensão de DCC ser filtradas por meio de transferência para um filtro de placas de microtitulação, para remover o DCC. Adicionar depois 100 µl do filtrado ao fluido de cintilação em frascos de LSC para determinação da desintegração por minuto (dpms) e por frasco por contagem da cintilação em meio líquido.

21. Em alternativa, se não estiver disponível um filtro de microplacas, a extração do DCC pode ser feita por centrifugação. Para evitar qualquer contaminação dos poços por contacto com o DCC, 50 µl do sobrenadante contendo [3H]17β-estradiol ligado ao hrERα devem ser retirados com extremo cuidado.

22. O ligando quente isolado é usado para determinar a desintegração por minuto (dpm) do [³H]17β-estradiol adicionado aos poços. A radioatividade deve ser quantificada imediatamente após a preparação. Estes poços não devem ser incubados e não devem ser tratados com a suspensão DCC, mas o seu conteúdo deve ser diretamente adicionado ao fluido de cintilação. Estas medidas demonstram quanto [³H]17β-estradiol em foi adicionado a cada conjunto de poços para a ligação total e para a ligação não específica.

Ensaio de ligação competitiva

23. O ensaio de ligação competitiva mede a ligação de uma única concentração de [³H]17β-estradiol na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo. Devem utilizar-se três replicados paralelos de cada concentração numa mesma série de ensaios. Além disso, devem efetuar-se três ensaios não paralelos para cada produto químico ensaiado. O ensaio deve ser configurado com uma ou várias placas de microtitulação de 96 poços.

Controlos

24. Durante a realização do ensaio, devem ser incluídos em cada experiência o solvente e os controlos paralelos (isto é, estrogénios de referência, ligante fraco e não ligante). As curvas de concentração inteiras para os estrogénios e os controlos de referência (por exemplo, ligante fraco e não ligante) devem ser utilizadas numa única placa em cada série de ensaios. Todas as outras placas devem conter: (i) uma concentração elevada (deslocamento máximo, ou seja, deslocamento quase total do ligando com marcação radioativa) e média (aproximadamente a IC₅₀) de cada um dos E2 e ligante fraco em triplicado; (ii) controlo do solvente e ligação não específica, cada um, no mínimo, em triplicado. Os procedimentos para a preparação do tampão de ensaio [³H]17β-estradiol, do hrERα e das soluções do produto químico em estudo são descritos de forma aprofundada no protocolo CERI (2).

Controlo do solvente

25. O controlo do solvente indica que o solvente não interage com o sistema de ensaio e mede a ligação total (TB). O DMSO é o solvente preferencial. Em alternativa, se a concentração mais elevada do produto químico em estudo não for solúvel em DMSO, pode ser utilizado etanol. A concentração de DMSO nos poços finais deve ser de 2,05 % e poderá ser aumentada para 2,5 % em caso de ausência de solubilidade do produto químico em estudo. As concentrações de DMSO acima de 2,5 % não devem ser utilizadas devido à interferência das concentrações mais elevadas de solvente no ensaio. Para ensaiar os produtos químicos que não são solúveis em DMSO, mas são solúveis em etanol, pode ser utilizado um máximo de 2 % de etanol no ensaio sem interferência.

Controlo do tampão

26. O controlo do tampão (BC) não deve conter solvente nem produto químico em estudo, mas deve conter todos os outros componentes do ensaio. Os resultados do controlo do tampão são comparados com o controlo do solvente, para verificar se o solvente utilizado não afeta o sistema de ensaio.

Ligante forte (estrogénio de referência)

27. O 17β-estradiol (n.º CAS 50-28-2) é o ligando endógeno e liga-se com elevada afinidade ao ER de subtipo alfa. Deve preparar-se uma curva padrão com 17β-estradiol não marcado para cada ensaio de ligação competitiva do hrERα, a fim de se proceder a uma avaliação da variabilidade entre ensaios realizados no mesmo laboratório. Devem ser preparadas oito soluções do 17β-estradiol não marcado em DMSO e no tampão de ensaio, com concentrações finais dos poços a utilizar na curva normal espaçada do seguinte modo: 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10^{-8,5}, 10⁻⁹, 10^{-9,5}, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹M. A maior concentração de 17β-estradiol (1 μM) não marcado deve ser o indicador de ligação não específico. Esta concentração distingue-se pelo rótulo «NSB» no quadro 4, embora também faça parte da curva-padrão.

Ligante fraco

28. Para demonstrar a sensibilidade de cada experiência e permitir uma avaliação da variabilidade ao longo do tempo, deve ser incluído um ligante fraco [noretinodrel (n.º CAS 68-23-5) ou noretinodrona (n.º CAS 68-22-4)]. Devem ser preparadas oito soluções de ligante fraco em DMSO e em tampão de ensaio, com as seguintes concentrações finais nos poços: 10^{-4,5}, 10^{-5,5}, 10⁻⁶, 10^{-6,5}, 10⁻⁷, 10^{-7,5}, 10⁻⁸ e 10⁻⁹ M.

Não ligante

29. O octiltrióxissilano (OTES, n.º CAS 2943-75-1) deve ser utilizado como controlo negativo (não ligante), que garante que o ensaio permite detetar os produtos químicos em estudo que não se ligam ao hrERα. Devem ser preparadas oito soluções do não ligante em DMSO e tampão de ensaio, com as seguintes concentrações finais nos poços: 10^{-3} , $10^3 10^{-4}$, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. O ftalato de di-*n*-butilo (DBP, n.º CAS 84-72-2) pode ser usado como uma alternativa não ligante, mas apenas ensaiado até 10^{-4} M. Demonstrou-se que a solubilidade máxima do DBP no ensaio é de 10^{-4} M⁴M.

Concentração do hrERα

30. Deve ser utilizada a quantidade de recetor que dá um valor específico de ligação de 40 ± 10 % (ver pontos 12-13 do apêndice 3). A solução hrERα deve ser preparada por diluição do hrERα funcional em tampão gelo frio imediatamente antes do uso.

[³H]17β-estradiol

31. A concentração final de [³H]17β-estradiol nos poços deve ser de 0,5 nM.

Produtos químicos em estudo

32. Em primeiro lugar, é necessário realizar um ensaio de solubilidade para determinar o limite de solubilidade de cada produto químico em estudo e identificar a gama de concentrações a utilizar na condução do protocolo de ensaio. O limite de solubilidade de cada substância química de ensaio deve ser determinado inicialmente no solvente e posteriormente confirmado em condições de ensaio. A concentração final estudada no ensaio não deve exceder 1 mM. O ensaio de determinação da gama inclui um controlo do solvente, juntamente com, pelo menos, 8 diluições sequenciais, com início na concentração máxima aceitável (por exemplo: 1 mM ou menos, com base no limite de solubilidade) e a presença de ligeira turbidez ou precipitado (ver também o ponto Apêndice 35). Uma vez determinada a gama de concentrações a ensaiar, o produto químico em estudo deve ser ensaiado utilizando curvas de intervalos de concentrações de 8 log, espaçadas conforme definido no ensaio de determinação de gama anterior. As concentrações ensaiadas na segunda e na terceira experiências devem ser novamente ajustadas, de modo a caracterizar melhor a curva concentração-resposta, se necessário.
33. As diluições do produto químico em estudo devem ser preparadas no solvente adequado (ver ponto 25 do apêndice 3). Se a concentração mais elevada do produto químico em estudo não for solúvel nem em DMSO nem em etanol e se a introdução de um novo solvente implicar uma concentração de solvente no tubo final superior ao limite aceitável, a concentração mais elevada pode ser reduzida para a concentração imediatamente inferior. Neste caso, pode ser acrescentada uma concentração adicional na extremidade inferior da série de concentrações. As outras concentrações das séries devem permanecer inalteradas.
34. As soluções do produto químico em estudo devem ser monitorizadas de perto quando adicionadas ao poço de ensaio, uma vez que o produto químico em estudo precipitar para fora do poço. Os dados relativos a todos os poços que contenham precipitado não devem ser tidos em conta e os respetivos motivos de exclusão devem ser anotados.
35. Se houver informação prévia, de outras fontes, que forneçam um $\log(\text{IC}_{50})$ de um produto químico em estudo, pode ser conveniente espaçar as diluições de forma geométrica, mais perto do $\log(\text{IC}_{50})$ esperado (ou seja, 0,5 unidades logarítmicas em torno do $\log(\text{IC}_{50})$ esperado). Os resultados finais deve refletir a extensão suficiente das concentrações para os dois lados do $\log(\text{IC}_{50})$, incluindo o «topo» e a «base», de modo a que a curva de ligação possa ser adequadamente caracterizada.

Organização da placa de ensaio

36. Devem ser preparadas placas de microtitulação marcadas, tendo em conta as incubações sêxtuplas, com códigos para o controlo do solvente, a concentração mais elevada do estrogénio de referência, que serve igualmente como indicador de ligação não específica (NSB), o controlo do tampão e incubações em triplicado de cada uma das oito concentrações do controlo não ligante (octiltrióxissilano), as sete concentrações mais baixas do estrogénio de referência, as oito concentrações das doses do ligante fraco (noretinodrel ou noretinodrina) e as oito concentrações de cada produto químico em estudo (TC). No quadro 4 figura um exemplo do diagrama da placa para as curvas de concentração inteiras dos estrogénios de referência e do controlo. São utilizadas placas de microtitulação adicionais para os produtos químicos em estudo e devem incluir controlos da placa, nomeadamente 1), uma concentração elevada (deslocamento máximo) e média (aproximadamente a IC_{50}) de cada um dos E2 e ligante fraco em triplicado; 2) controlo do solvente (como ligante total) e ligação não específica, cada uma sextuplicada (quadro 5). O apêndice 3.3 apresenta um exemplo de folha de cálculo com um esquema de configuração das placas de microtitulação com três produtos químicos em estudo desconhecidos para o ensaio de ligação competitiva. As concentrações indicadas na folha de cálculo, bem como nos quadros 4 e 5, referem-se às concentrações finais utilizadas em cada ensaio. A concentração máxima para E2 deve ser 1×10^{-7} M e, para o ligante fraco, deve ser usada a concentração mais elevada utilizada para o ligante fraco na placa 1. A concentração IC_{50} deve ser determinada pelo laboratório com base na sua base de dados históricos de controlo. Prevê-se que este valor seja semelhante ao observado nos estudos de validação (ver quadro 1).

Quadro 4

Configuração das placas de microtitulação para o ensaio de ligação competitiva ⁽¹⁾ ⁽²⁾, curvas de concentração inteiras para os estrogénios e os controlos de referência (placa 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Controlo do tampão e controlo positivo (E2)			Fracamente positivo Noretinodrel			Controlo negativo (OTES)			TB e NSB		
A	Vazio (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (controlo de solvente) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (E2 10^{-6} M)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Tampão de controlo		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Vazio (para quente) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

⁽¹⁾ Amostra preparada para a placa de microtitulação normal, a utilizar em todas as experiências.

⁽²⁾ Note que esta placa de microtitulação é feita utilizando as diluições feitas na placa de diluição descrita para as normas referidas nas secções anteriores.

Neste exemplo, o ligando fraco é o noretinodrel (NE)

(*) Vazio verdadeiro, poço não utilizado

(**) Vazio, não utilizado durante a incubação, mas utilizado para confirmar a radioatividade total acrescentada.

Quadro 5

Materiais de simulação para a produção de placas vinculativas, placas adicionais vinculativas, placas adicionais para produtos químicos de ensaio (TC) e placas de controlo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Produto químico em estudo-1 (TC-1)			Produto químico em estudo-2 (TC-2)			Produto químico em estudo-3 (TE-3)			Controlos		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC ₅₀)		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4.5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC ₅₀)		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (E2 10^{-6} M)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (controlo de solvente)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Neste exemplo, o ligando fraco é o noretinodrel (NE)

Realização do ensaio de ligação competitiva

37. Com exceção dos poços destinados a ligação total e dos vazios (para quente), conforme ao quadro 6, introduzir em cada poço 50 µl de tampão de ensaio e misturar com 10 µl do controlo do solvente, estrogénio de referência (E2), ligante fraco, não ligante e produto químico em estudo, respetivamente, 10 µl de uma solução a 5 nM de [3H]17β-estradiol. Em seguida, adicionar 30 µl de solução do recetor gelo frio a cada placa e misturar delicadamente. A solução de hrERα deve ser o último reagente a ser adicionado. As placas de microtitulação do ensaio devem ser incubadas à temperatura ambiente (22-28 °C) durante 2 horas.

Quadro 6

Quantidade de componentes de ensaio para o ensaio de ligação competitiva nos hrER, placas microtituladoras

Etapas de preparação		Outros que não os poços de TB	Poços de TB	Vazio (para quente)
Volume dos componentes para os poços de reação acima e ordem de adição	Tampão de ensaio à temperatura ambiente	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 não marcado, ligante fraco não ligante, solventes e produtos químicos de ensaio (*)	10 µl	—	—
	[3H]17β-estradiol para concentração final de 0,5 nM (i.e. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Concentração de hrERα conforme determinada (ver pontos 12-13)	30 µl	30 µl	—
Volume total em cada poço		100 µl	100 µl	100 µl

(*) preparado corretamente para obter uma concentração final dentro da concentração aceitável do solvente.

38. Deve proceder-se à quantificação do valor da ligação do [³H]17β-estradiol ao hrERα, após a separação do [³H]17β-estradiol ligado ao hrERα do [³H]17β-estradiol livre mediante a adição de 100 μl de suspensão de DCC gelo frio a cada poço, conforme descrito nos pontos 21 a 23 do apêndice 3 para o ensaio de ligação por saturação.
39. Os poços G10-12 e H10-12, identificados como vazios (para quente) no quadro 4, representam o dpms do [³H]17β-estradiol marcado em 10 μl. A alíquota de 10 μl deve ser diretamente adicionada ao fluido de cintilação.

Critérios de aceitabilidade

Ensaio de ligação por saturação

40. A curva de ligação específica deve atingir um patamar elevado à medida em que forem sendo utilizadas concentrações crescentes de [³H]17β-estradiol, indicando saturação do hrERα com o ligando.
41. A ligação específica a 0,5 nM de [³H]17β-estradiol deve situar-se na gama aceitável, entre 30 % e 50 % da média da radioatividade total medida adicionada ao longo nas diferentes séries de ensaio. São aceitáveis pequenos desvios a este intervalo, mas se as séries de ensaios se situarem permanentemente fora deste intervalo de variação, ou se uma série de ensaios estiver consideravelmente fora deste intervalo, a concentração de proteínas deve ser ajustada, repetindo-se o ensaio de saturação.
42. Os dados devem produzir um diagrama linear de Scatchard.
43. A ligação não específica não deve ser excessiva. O valor da ligação não específica deve, normalmente, ser < 35 % da ligação total. No entanto, o rácio pode, ocasionalmente, ultrapassar este limite quando é medido um dpm muito baixo para a concentração mais baixa de 17β-estradiol com marcação radioativa do β-estradiol.

Ensaio de ligação competitiva

44. O aumento das concentrações do 17β-estradiol não marcado deve deslocar o [³H]17β-estradiol do recetor de forma compatível com uma ligação competitiva num sítio.
45. O valor de IC₅₀ para o estrogénio de referência (i.e., 17β-estradiol) deve ser aproximadamente igual à concentração molar de [³H]17β-estradiol mais o K_d determinado a partir do ensaio de saturação da ligação.
46. A ligação específica total deve estar consistentemente dentro de um intervalo aceitável de 40±10 % quando a concentração média de radioatividade total medida adicionada a cada poço for de 0,5 nM nas séries de ensaios. São aceitáveis pequenos desvios a este intervalo, mas se as séries de ensaios se situarem permanentemente fora deste intervalo de variação, ou se uma série de ensaios estiver consideravelmente fora deste intervalo, a concentração de proteínas deve ser ajustada.
47. O solvente não deve alterar a sensibilidade ou a reprodutibilidade do ensaio. Os resultados do controlo do solvente (poços de TB) são comparados com o controlo de tampão, a fim de verificar se o solvente utilizado não afeta o sistema de ensaio. Os resultados do TB e do controlo da solução-tampão devem ser comparáveis se não houver nenhum efeito do solvente no ensaio.
48. O não ligante não deve deslocar mais de 25 % do [³H]17β-estradiol do hrERα quando ensaiado até 10⁻³ M (OTES) ou 10⁻⁴ M (DBP).

49. Foram desenvolvidos critérios de desempenho para os estrogénios de referência e dois ligantes fracos (por exemplo, noretinodrel, noretindrona) com base nos dados do estudo de validação do ensaio de ligação CERIhrER (anexo N da referência 2). A média de 95 % de intervalos de confiança é fornecida para o DP médio (n) de todos os controlos em quatro laboratórios que participaram no estudo de validação. Foram calculados intervalos de confiança de 95 % para os parâmetros de ajustamento da curva [isto é, topo, base, curva de Hill e $\log(IC_{50})$] para os estrogénios de referência e os ligantes fracos, e o $\log_{10}(RBA) \log_{10}RBA$ dos ligantes fracos em relação aos estrogénios de referência. O quadro 1 apresenta os intervalos previstos para os parâmetros de ajustamento da curva que podem ser utilizados como critérios de desempenho. Na prática, o IC_{50} pode variar ligeiramente em função dos valores de K_d obtidos experimentalmente a partir da preparação de recetor e da concentração de ligando utilizados para o ensaio.
50. Não foram definidos critérios de desempenho para os parâmetros de ajustamento da curva em relação aos produtos químicos em estudo, devido à grande variedade de produtos químicos em estudo existentes e à variação das principais afinidades e dos resultados (p. ex., curva inteira, curva parcial, sem ajustamento de curva). Contudo, devem ser utilizados critérios profissionais aquando da avaliação dos resultados de cada série de ensaios para um produto químico em estudo. Deve ser utilizada uma gama de concentrações do produto químico em estudo suficiente para definir claramente o topo (por exemplo, 90-100 % de ligação) da curva de ligação competitiva. A variabilidade dos replicados para cada concentração do produto químico em estudo, bem como entre as 3 séries não paralelas, deve ser razoável e cientificamente aceitável. Os controlos de cada ciclo para um produto químico em estudo devem abordar as medidas de desempenho comunicadas para este ensaio CERI e ser coerentes com os dados históricos de controlo de cada laboratório.

ANÁLISE DOS DADOS

Ensaio de ligação por saturação

51. São medidas as ligações totais e as ligações não específicas. A partir destes valores, a ligação específica de concentrações crescentes de $[^3H]17\beta$ -estradiol em condições de equilíbrio é calculada subtraindo-se a ligação não específica do total. Um gráfico que apresente a ligação específica *versus* a concentração de $[^3H]17\beta$ -estradiol deve atingir um plano para o indicativo máximo específico da ligação por saturação do hrER α $[^3-17H]\beta$ -estradiol. Além disso, a análise dos dados deve documentar a ligação do $[^3H]17\beta$ -estradiol a um único ponto de ligação de alta afinidade. As ligações não específicas, totais e específicas devem ser visíveis numa curva de ligação por saturação. Uma análise mais aprofundada destes dados deve utilizar uma análise de regressão não linear (ex., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) com uma apresentação final dos dados de acordo com Scatchard.
52. A análise de dados deve determinar o $B_{m\acute{a}x}$ e a K_d a partir, unicamente dos dados relativos à ligação total, partindo do pressuposto de que a ligação não específica é de linear, salvo se for justificada a utilização de outro método. Quando se determinar a melhor adequação, deve utilizar-se uma regressão sólida, a menos que seja apresentada uma justificação. Deve ser indicado método escolhido para uma regressão sólida. A correção da depleção de ligando (por exemplo, utilizando o método de Swillens 1995) deve ser sempre utilizada na determinação de $B_{m\acute{a}x}$ e K_d a partir dos dados da ligação por saturação.

Ensaio de ligação competitiva

53. A curva de ligação competitiva é representada como a ligação específica do $[^3H]17\beta$ -estradiol *versus* a concentração $[\log_{10}(\text{unidades})]$ do concorrente. A concentração do produto químico em estudo que inibe 50 % da ligação máxima específica do $[^3H]17\beta$ -estradiol é IC_{50} .
54. As estimativas de $\log(IC_{50})$ para os controlos positivos (por exemplo, estrogénios de referência e ligantes fracos) devem ser determinadas com recurso a um *software* de ajustamento não linear de ajustamento adequado, a fim de se adaptar à equação de quatro parâmetros de Hill (p. ex., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Em geral, o topo, a base, a curva e o $\log(IC_{50})$ devem ser mantidos inalterados quando se ajustam as curvas. Quando se determinar a melhor adequação, deve utilizar-se uma regressão sólida, a menos que seja apresentada uma justificação. Não devem ser feitas correções para a depleção do ligando. Após a análise inicial, cada curva de ligação deve ser avaliada de modo a garantir a devida adequação ao modelo. A afinidade de ligação relativa (RBA) do ligando fraco deve ser calculada como percentagem do $\log(IC_{50})$ para o ligante fraco em relação ao $\log(IC_{50})$ para o 17β -estradiol. Os resultados dos controlos positivos e do controlo do não ligante devem ser avaliados de acordo com as medidas do desempenho do ensaio constantes dos pontos 44 a 49 do presente apêndice 3.

55. Os dados relativos a todos os produtos químicos em estudo devem ser analisados através de uma abordagem por etapas, para garantir que os dados são devidamente analisados e que cada ligação competitiva é devidamente classificada. Recomenda-se que cada série de ensaios para um produto químico em estudo seja inicialmente submetida a uma análise normalizada de dados idêntica à utilizada para os estrogénios de referência e para controlos de ligantes fracos (ponto 54 do presente apêndice 3). Uma vez concluída, deve ser efetuada uma avaliação técnica dos parâmetros de ajustamento da curva, bem como uma análise visual do grau de adequação dos dados à curva de ligação competitiva gerada para cada série de ensaios. Durante esta avaliação técnica, as observações de uma diminuição dependente da concentração do [3H]17β-estradiol especificamente ligado, da baixa variabilidade entre os replicados técnicos em cada concentração do produto químico em estudo e da coerência dos parâmetros de ajustamento entre as três séries de ensaios constituem uma boa indicação de que a análise de ensaios e de dados foi realizada de forma adequada.

Interpretação dos dados

56. Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado um ligante para o hrERA se for possível ajustar uma curva ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for inferior a 50 % (figura 1).
57. O produto químico em estudo é considerado como não ligante se, cumpridos todos os critérios de aceitabilidade:
- For possível ajustar uma curva de ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for superior a 75 %, ou
 - Não for possível ajustar uma curva de ligação e a média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração dos dados for superior a 75 %.
58. Os produtos químicos em estudo são considerados equívocos se nenhuma das condições acima referidas estiver preenchida (por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

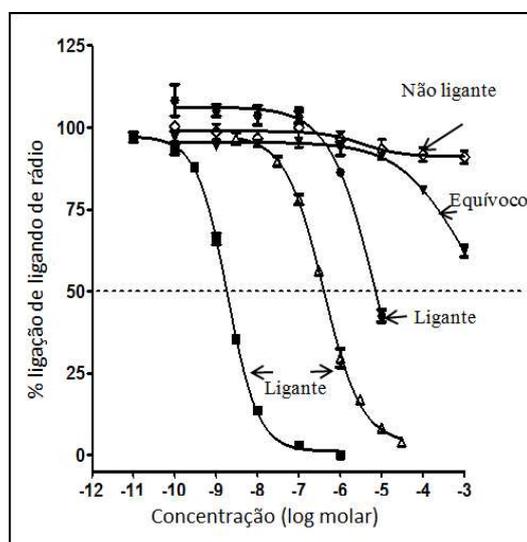
Quadro 7

Critérios para classificação com base numa curva de ligação competitiva para um produto químico em estudo

Classificação	Critérios
Ligante ^a	Uma curva de ligação pode ser ajustada. O ponto mais baixo na curva de resposta dentro da gama de dados é inferior a 50 % .
Não ligante ^b	Se for possível ajustar a curva de ligação, o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados é superior a 75 % . Se não for possível ajustar a curva de ligação, a média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração nos dados é superior a 75 % .
Inconclusivo ^c	Qualquer produto químico em estudo que não seja ligante nem não ligante. (Por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

Figura 1

Exemplos de classificação de produtos químicos em estudo por meio de uma curva de ligação competitiva



59. As várias séries de ensaios realizados num laboratório para um produto químico em estudo são combinadas através da atribuição de valores numéricos a cada série de ensaios e fazendo a média das diferentes séries, como se indica no quadro 8. Os resultados para as séries combinadas em cada laboratório são comparados com a classificação prevista para cada produto químico em estudo.

Quadro 8

Método de classificação do produto químico em estudo utilizando múltiplas séries de ensaios

Para atribuir valor a cada série de ensaios:

Classificação	Valor numérico
Ligante	2
Inconclusivo	1
Não ligante	0

Para classificar a média dos valores numéricos das diferentes séries de ensaios:

Classificação	Valor numérico
Ligante	Média $\geq 1,5$
Inconclusivo	$0,5 \leq \text{média} < 1,5$
Não ligante	Média $< 0,5$

RELATÓRIO DO ENSAIO

60. Ver ponto 24 de «COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO hrER» do presente método de ensaio.

Apêndice 3.1

LISTA DE TERMOS

DCC: carvão revestido com dextrose.

[³H]E2: 17β-estradiol com marcação radioativa por trítio.

E2: 17β-estradiol não marcado (inerte).

hrERα: recetor alfa de estrogénio recombinante humano (domínio de ligação do ligando).

Replicado: um ou vários poços que contêm o mesmo conteúdo com as mesmas concentrações e que são objeto de ensaios paralelos numa única série de ensaios. Neste protocolo, cada concentração do produto químico em estudo é ensaiada em triplicado; isto é, existem três replicados que são ensaiados simultaneamente em cada concentração do produto químico em estudo.

Série de ensaios: conjunto completo de poços de placas de microtitulação que fornece todas as informações necessárias para caracterizar a ligação de um produto químico em estudo ao hrERα (viz., total [³H]17β-estradiol adicionado ao poço, ligação máxima do [³H]17β-estradiol ao hrERα, ligação não específica e ligação total em diferentes concentrações do produto químico em estudo). Uma série de ensaio pode consistir em apenas um poço de ensaio (ou seja, replicado) por concentração; contudo, dado que este protocolo requer que os ensaios sejam realizados em triplicado, uma série de ensaios consiste em três poços por concentração. Além disso, este protocolo requer três séries de ensaio independentes (ou seja, não paralelas) por produto químico.

Tampão de ensaio: 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, contendo 1 mM de EDTA, EGTA 1 mM, 1 mM NaVO₃, 10 % de glicerol, 0,2 mM de leupeptina, 1 mM ditiotritol e 10 mg/ml de albumina sérica bovina.

Apêndice 3.2

CONFIGURAÇÃO DO ENSAIO DE LIGAÇÃO COMPETITIVA

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (μ l)	Volume do tampão (μ l)	Volume (μ l) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (μ l)	Volume final (μ l)	Concentração final do concorrente (M)
S	A1	1	Em branco	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Em branco	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Em branco	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 frio	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	E2 frio	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	E2 frio	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	E2 frio	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	E2 frio	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	E2 frio	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	E2 frio	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	E2 frio	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	D3	3	E2 frio	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,,2E-10
S	E1	1	E2 frio	S	S4	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	E2	2	E2 frio	S	S4	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	E3	3	E2 frio	S	S4	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	F1	1	E2 frio	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,,2E-09
S	F2	2	E2 frio	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,,2E-09
S	F3	3	E2 frio	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,,2E-09
S	G1	1	E2 frio	S	S6	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	G2	2	E2 frio	S	S6	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	G3	3	E2 frio	S	S6	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	H1	1	E2 frio	S	S7	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	H2	2	E2 frio	S	S7	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	H3	3	E2 frio	S	S7	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	A4	1	Noretinodrel	NE	WP1	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	A5	2	Noretinodrel	NE	WP1	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	A6	3	Noretinodrel	NE	WP1	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	B4	1	Noretinodrel	NE	WP2	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	B5	2	Noretinodrel	NE	WP2	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	B6	3	Noretinodrel	NE	WP2	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	C4	1	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,,2E-08
S	C5	2	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,,2E-08
S	C6	3	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,,2E-08
S	D4	1	Noretinodrel	NE	WP4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	D5	2	Noretinodrel	NE	WP4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	D6	3	Noretinodrel	NE	WP4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	E4	1	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,,2E-07

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	E5	2	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,,2E-07
S	E6	3	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,,2E-07
S	F4	1	Noretinodrel	NE	WP6	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	F5	2	Noretinodrel	NE	WP6	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	F6	3	Noretinodrel	NE	WP6	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	G4	1	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,,2E-06
S	G5	2	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,,2E-06
S	G6	3	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,,2E-06
S	H4	1	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,,2E-05
S	H5	2	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,,2E-05
S	H6	3	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,,0E-10

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,,00E-04	30	50	10	10	100	1,,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,,00E-04	30	50	10	10	100	1,,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,,00E-04	30	50	10	10	100	1,,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,,00E-03	30	50	10	10	100	1,,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,,00E-03	30	50	10	10	100	1,,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,,00E-03	30	50	10	10	100	1,,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8D-BP7	1,,00E-02	30	50	10	10	100	1,,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,,00E-02	30	50	10	10	100	1,,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,,00E-02	30	50	10	10	100	1,,0E-03
S	A10	1	Ligação total	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	Ligação total	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	Ligação total	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	Ligação total	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	B11	5	Ligação total	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	Ligação total	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	E2 frio (elevado)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	E2 frio (elevado)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	E2 frio (elevado)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	E2 frio (elevado)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	E2 frio (elevado)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	E2 frio (elevado)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Tampão de controlo	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Tampão de controlo	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Tampão de controlo	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Tampão de controlo	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Tampão de controlo	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Tampão de controlo	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Vazio (para quente)	Quente	H1	—	90	—	10	—	100	—

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	G11 (*)	2	Vazio (para quente)	Quente	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Vazio (para quente)	Quente	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Vazio (para quente)	Quente	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Vazio (para quente)	Quente	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Vazio (para quente)	Quente	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Desconhecido 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Desconhecido 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Desconhecido 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Desconhecido 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Desconhecido 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Desconhecido 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Desconhecido 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Desconhecido 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Desconhecido 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	D1	1	Desconhecido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Desconhecido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Desconhecido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Desconhecido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Desconhecido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Desconhecido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Desconhecido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Desconhecido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Desconhecido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Desconhecido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Desconhecido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Desconhecido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Desconhecido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Desconhecido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	H3	3	Desconhecido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Desconhecido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Desconhecido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Desconhecido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Desconhecido 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Desconhecido 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Desconhecido 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Desconhecido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Desconhecido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Desconhecido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Desconhecido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Desconhecido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Desconhecido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Desconhecido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	E5	2	Desconhecido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Desconhecido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Desconhecido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Desconhecido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Desconhecido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Desconhecido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Desconhecido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Desconhecido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Desconhecido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Desconhecido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Desconhecido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Desconhecido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Desconhecido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Desconhecido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)	
P1	B7	1	Desconhecido	3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Desconhecido	3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Desconhecido	3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Desconhecido	3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Desconhecido	3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Desconhecido	3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Desconhecido	3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Desconhecido	3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Desconhecido	3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Desconhecido	3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Desconhecido	3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Desconhecido	3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Desconhecido	3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Desconhecido	3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (μ l)	Volume do tampão (μ l)	Volume (μ l) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (μ l)	Volume final (μ l)	Concentração final do concorrente (M)	
P1	F9	3	Desconhecido	3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Desconhecido	3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Desconhecido	3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Desconhecido	3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Desconhecido	3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Desconhecido	3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Desconhecido	3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Controlo E2 (máx.)	S	E2 _{máx} 1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07	
P1	A11	2	Controlo E2 (máx.)	S	E2 _{máx} 2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07	
P1	A12	3	Controlo E2 (máx.)	S	E2 _{máx} 3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07	
P1	B10	1	Controlo E2 (IC50)	S	E2IC ₅₀ 1	E2IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀	
P1	B11	2	Controlo E2 (IC50)	S	E2IC ₅₀ 2	E2IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀	
P1	B12	3	Controlo E2 (IC50)	S	E2IC ₅₀ 3	E2IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀	

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	C10	1	Controlo NE (máx.)	S	Ne _{máx} 1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Controlo NE (máx.)	S	Ne _{máx} 2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Controlo NE (máx.)	S	Ne _{máx} 3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Controlo NE (IC50)	S	NEIC ₅₀ 1	NEIC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D11	2	Controlo NE (IC50)	S	NEIC ₅₀ 2	NEIC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D12	3	Controlo NE (IC50)	S	NEIC ₅₀ 3	NEIC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	E10	1	E2 frio (elevado)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	E2 frio (elevado)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	E2 frio (elevado)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	E2 frio (elevado)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	E2 frio (elevado)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	E2 frio (elevado)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (μ l)	Volume do tampão (μ l)	Volume (μ l) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (μ l)	Volume final (μ l)	Concentração final do concorrente (M)
P1	G10	1	Ligação total	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	Ligação total	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	Ligação total	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	Ligação total	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	Ligação total	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	Ligação total	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Note-se que os poços «quentes» estão vazios durante a incubação. Os 10 μ l são adicionados apenas para contagem de cintilação.

Apêndice 4

CONSIDERAÇÕES PARA A ANÁLISE DE DADOS DO ENSAIO DE LIGAÇÃO COMPETITIVA HRER

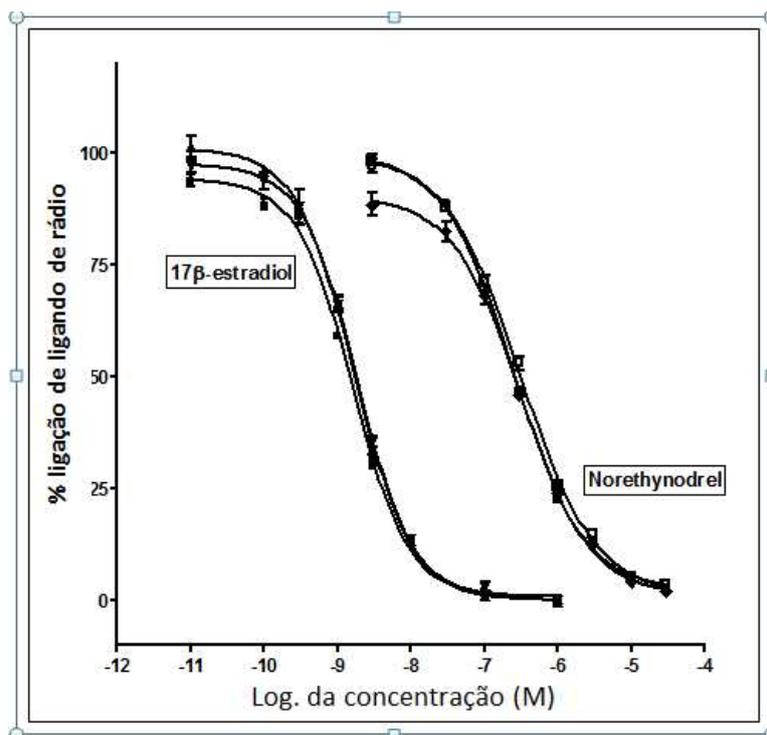
1. O ensaio de ligação competitiva hrER α mede a ligação de uma única concentração de [^3H]17 β -estradiol na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo. A curva de ligação competitiva é representada como a ligação específica do [^3H]17 β -estradiol *versus* a concentração [\log_{10} (unidades)] do concorrente. A concentração do produto químico em estudo que inibe 50 % da ligação máxima específica do [^3H]17 β -estradiol é IC $_{50}$.

Análise de dados para estrogénios de referência e ligante fraco (1)

2. Os dados do controlo (isto é, a percentagem de ligação específica do [^3H]17 β -estradiol e o logaritmo da concentração do produto químico de controlo) são transformados para análise. As estimativas de $\log(\text{IC}_{50})$ para os controlos positivos (por exemplo, estrogénios de referência e ligantes fracos) devem ser determinadas com recurso a um *software* de ajustamento não linear de ajustamento adequado, a fim de se adaptar à equação de quatro parâmetros de Hill (p. ex., BioSoft, GraphPad Prism). Em geral, o topo, a base, a curva e o $\log(\text{IC}_{50})$ devem ser mantidos inalterados quando se ajustam as curvas. Quando se determinar a melhor adequação, deve utilizar-se uma regressão sólida, a menos que seja apresentada uma justificação. Deve ser indicado método escolhido para uma regressão sólida. Não foi necessária correção da depleção do ligando para os ensaios de FW ou hrER do CER1, mas tal pode ser considerado, se necessário. Após a análise inicial, cada curva de ligação deve ser avaliada de modo a assegurar a adequação ao modelo. A afinidade de ligação relativa (RBA) do ligante fraco pode ser calculada como percentagem do $\log(\text{IC}_{50})$ para o ligante fraco em relação ao $\log(\text{IC}_{50})$ para o 17 β -estradiol. Os resultados dos controlos positivos e do controlo do não ligante devem ser avaliados utilizando medidas de desempenho do ensaio e critérios de aceitabilidade conforme descritos no presente método de ensaio (ponto 20), no apêndice 2 (ensaio FW, pontos 41-51) e no apêndice 3 (ensaio CER1, pontos 41 a 51). A figura 1 apresenta exemplos de 3 séries de ensaios para os estrogénios de referência e os ligantes fracos.

Figura 1

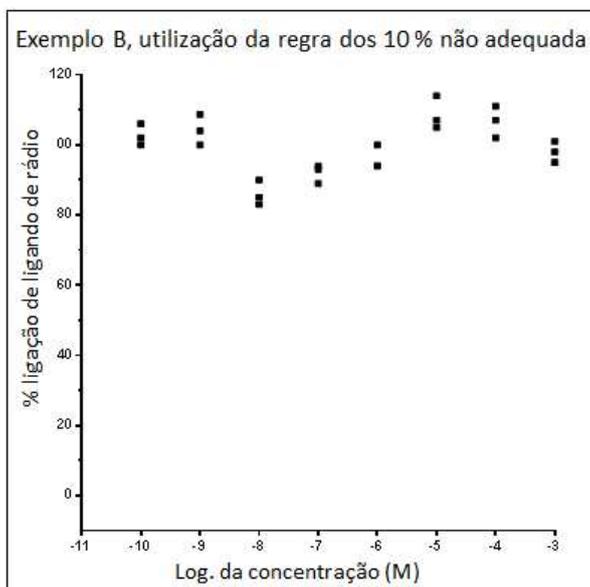
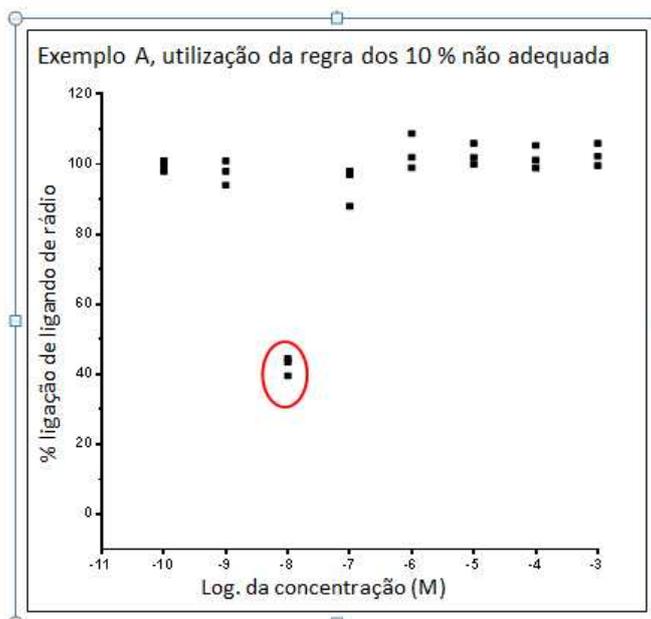
Exemplos de curvas de ligação competitiva para os estrogénios de referência e para o controlo do ligante fraco



5. A utilização adequada da regra dos 10 % para corrigir estas curvas deve ser cuidadosamente considerada e reservada para os casos em que exista uma forte indicação de uma ligante hrER. Durante a realização de experiências para o estudo de validação do ensaio de ligação hrER de FW, observou-se que a regra dos 10 % tinha por vezes uma consequência imprevista e inesperada. Os produtos químicos que não interagiam com o recetor (ou seja, os verdadeiros não ligantes) apresentavam frequentemente uma variabilidade de cerca de 100 % para a ligação radioativa que era superior a 10 % da gama de concentrações ensaiadas. Se o valor mais baixo correspondesse a uma concentração baixa, os dados de todas as concentrações mais elevadas poderiam potencialmente ser eliminados da análise, através da regra dos 10 %, mesmo que essas concentrações pudessem ser úteis para determinar se o produto químico era não ligante. A figura 3 mostra exemplos de situações em que a utilização da regra dos 10 % não é adequada.

Figura3

Exemplos, dados sobre a ligação competitiva em que não é adequada a aplicação da regra dos 10 %



Referências bibliográficas

- (1) OCDE (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERA)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf
- (3) Laws SC, Yavanhxy S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. *Toxicological Sci.* 94(1):46-56.

B.71 ENSAIOS DE SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* RESPEITANTES A EVENTOS ESSENCIAIS DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA VIA DETERMINANTE DOS EFEITOS NOCIVOS PARA A SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

INTRODUÇÃO GERAL

Método de ensaio baseado no evento essencial relativo à ativação das células dendríticas

1. Um sensibilizante cutâneo é uma substância que provoca uma reação alérgica após contacto com a pele, conforme definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (GHS da ONU) (1) e o Regulamento (UE) n.º 1272/2008 relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CLP) (1). Existe consenso quanto aos principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. Os conhecimentos atuais sobre os mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea foram sintetizados na forma de uma via determinante dos efeitos nocivos (AOP – *Adverse Outcome Pathway*) no âmbito do programa AOP da OCDE (2), desde o evento molecular iniciador, passando pelos eventos intermédios, até ao efeito nocivo, designadamente a dermatite alérgica de contacto. Neste caso, o evento molecular iniciador (isto é, o primeiro evento essencial) é a ligação covalente das substâncias eletrófilas aos centros nucleófilos das proteínas da pele. O segundo evento essencial nesta AOP tem lugar nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como variações na expressão de genes associadas a vias de sinalização celular específicas, como as vias dependentes do elemento de resposta antioxidante/eletrófilo (ARE – *Antioxidant Response Element*). O terceiro evento essencial é a ativação das células dendríticas, normalmente avaliada com base na expressão de marcadores específicos da superfície celular (quimocinas e citocinas). O quarto evento essencial consiste na ativação e na proliferação de células T, que é avaliada indiretamente no ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (LLNA – *Local Lymph Node Assay*) (3).
2. O presente método de ensaio é equivalente à orientação de ensaio (TG — *Test Guideline*) 442E (2017) da OCDE. Descreve os ensaios *in vitro* respeitantes aos mecanismos descritos no evento essencial relativo à ativação das células dendríticas na AOP para a sensibilização cutânea (2). O método de ensaio inclui ensaios para apoiar a discriminação entre sensibilizantes e não sensibilizantes cutâneos, em conformidade com o GHS da ONU e com o CLP.

Os ensaios descritos no presente método de ensaio são os seguintes:

- Teste de ativação da linha celular humana (h-CLAT)
- Teste de ativação da linha celular U937 (U-SENS™)
- Ensaio por gene repórter da interleucina-8 (ensaio IL-8 Luc)

3. Os ensaios incluídos no presente método e as orientações de ensaio da OCDE correspondentes podem diferir em relação ao procedimento utilizado para gerar os dados e efetuar as medições, mas podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as exigências dos países quanto aos resultados dos ensaios sobre o evento essencial de ativação das células dendríticas na AOP para a sensibilização cutânea, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados da OCDE.

(1) 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 353/1 de 31.12.2008, p. 1).

Antecedentes e princípios dos ensaios incluídos no método de ensaio baseado nos eventos essenciais

4. Tradicionalmente, a determinação da sensibilização cutânea implica o recurso a animais de laboratório. Os métodos clássicos que utilizam porquinhos-da-índia — ensaio de maximização com porquinhos-da-índia (GMPT) de Magnusson e Kligman e ensaio de Buehler (TM B.6) (4) — avaliam as fases de indução e de desencadeamento da sensibilização cutânea. Vulgarizaram-se também os ensaios com murídeos, o LLNA (TM B.42) (3) e duas alterações deste sem recurso a isótopos radioativos — LLNA: DA (TM B.50) (5) e LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6) —, que determinam exclusivamente a resposta indutiva, uma vez que apresentam vantagem em relação aos ensaios com porquinhos-da-índia no tocante ao bem-estar animal e proporcionam uma medição objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.
5. Mais recentemente, foram adotados métodos de ensaio de tipo mecanístico *in chemico* e *in vitro* respeitantes ao primeiro evento essencial (TM B.59; ensaio de reatividade direta de péptidos (7)) e ao segundo evento essencial [TM B.60; método ARE-Nrf2 luciferase (8)] da AOP de sensibilização cutânea, a fim de contribuir para a avaliação do potencial de perigo de sensibilização cutânea dos produtos químicos.
6. Os ensaios descritos no presente método de ensaio permitem quantificar quer as variações na expressão do(s) marcador(es) da superfície celular associada(s) ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas após a exposição a um sensibilizante (por exemplo, CD54, CD86), quer as variações na expressão da IL-8, uma citocina associada à ativação das células dendríticas. Existem referências de que os sensibilizantes cutâneos induzem a expressão de marcadores da membrana celular, nomeadamente CD40, CD54, CD80, CD83 e CD86, para além de induzirem citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β e a TNF- α , e várias quimocinas, entre as quais a IL-8 (CXCL8) e a CCL3 (9) (10) (11) (12), associados à ativação das células dendríticas (2).
7. No entanto, como a ativação das células dendríticas representa apenas um evento essencial da AOP de sensibilização cutânea (2) (13), as informações geradas pelos ensaios que medem unicamente os marcadores da ativação das células dendríticas podem não bastar para concluir a existência ou ausência de potencial de sensibilização cutânea dos produtos químicos. Por conseguinte, propõem-se os dados gerados com os ensaios descritos no presente método de ensaio para ajudar a distinguir os sensibilizantes (ou seja, categoria 1 do GHS da ONU/CLP) dos não sensibilizantes cutâneos utilizados no âmbito das abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA — *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), juntamente com outras informações complementares decorrentes, por exemplo, de ensaios *in vitro* respeitantes a outros eventos essenciais da AOP de sensibilização cutânea, bem como métodos sem ensaios, nomeadamente a interpolação com base em dados relativos a produtos químicos análogos (13). Encontram-se na literatura exemplos de utilização dos dados obtidos com estes ensaios no âmbito de abordagens definidas – ou seja, abordagens normalizadas no que diz respeito ao conjunto de fontes de informação utilizadas e aos procedimentos de análise dos dados para efeitos de previsão (13) –, que podem ser elementos úteis no âmbito das IATA.
8. Os ensaios descritos no presente método não podem ser utilizados isoladamente, nem para classificar os sensibilizantes cutâneos nas subcategorias 1A e 1B do GHS da ONU/CLP pelas autoridades responsáveis pela aplicação destas duas subcategorias facultativas, nem para prever o potencial de sensibilização no contexto de avaliações de segurança. Todavia, consoante o quadro regulamentar, os resultados positivos obtidos com estes métodos podem ser utilizados isoladamente para classificar um produto químico na categoria 1 do GHS da ONU/CLP.
9. No presente método de ensaio, o termo «produto químico em estudo» designa o produto que é objeto do ensaio ⁽¹⁾ e não as substâncias monocomponentes, substâncias multicomponentes e/ou misturas às quais os métodos sejam aplicáveis. Atualmente, dispõe-se de informações limitadas sobre a aplicabilidade dos ensaios a substâncias multicomponentes/misturas (14) (15). Os ensaios são, porém, tecnicamente aplicáveis ao ensaio de substâncias multicomponentes e misturas. Contudo, antes da aplicação do presente método de ensaio a uma mistura para se obterem dados para efeitos regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito ⁽²⁾. Tais considerações não são necessárias se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. Acresce que, no caso de ensaios de substâncias multicomponentes ou de misturas, deve ser tida em conta a possível interferência de componentes citotóxicos com as respostas observadas.

⁽¹⁾ Em junho de 2013, na Reunião Conjunta da OCDE, foi decidido que, sempre que possível, deverá ser aplicada uma utilização mais coerente do termo «produto químico em estudo», descrevendo o produto que é objeto do ensaio em orientações de ensaio novas e atualizadas da OCDE.

⁽²⁾ Esta frase foi proposta e aprovada na reunião do WNT de abril de 2014

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Capítulo B.42 do presente anexo: Ensaio de gânglios linfáticos locais.
- (4) Capítulo B.6 do presente anexo: Sensibilização cutânea.
- (5) Capítulo B.50 do presente anexo: Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: DA.
- (6) Capítulo B.51 do presente anexo: Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: BrdU-ELISA.
- (7) Capítulo B.59 do presente anexo: Sensibilização cutânea *in chemico*: ensaio de reatividade direta de péptidos (DPRA).
- (8) Capítulo B.60 do presente anexo: Sensibilização cutânea *in vitro*: método ARE-Nrf2 luciferase.
- (9) Steinhman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.

- (12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.
- (13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Apêndice 1

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO: TESTE DE ATIVAÇÃO DA LINHA CELULAR HUMANA (H-CLAT)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. O método de ensaio h-CLAT permite quantificar as variações na expressão dos marcadores da superfície celular associadas ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas (ou seja, CD86 e CD54), na linha celular da leucemia monocítica humana THP-1, após a exposição a sensibilizantes (1) (2). Os níveis de expressão medidos para os marcadores da superfície celular CD86 e CD54 são, em seguida, utilizados para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.
2. O método de ensaio h-CLAT foi avaliado num estudo de validação coordenado pelo Laboratório de Referência da União Europeia para as Alternativas à Experimentação em Animais (EURL ECVAM), seguido de uma análise independente por pares do Comité Científico Consultivo do EURL ECVAM (ESAC). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o método foi recomendado pelo EURL ECVAM (3) para utilização no âmbito de uma IATA, com o objetivo de ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. As referências bibliográficas contêm exemplos da utilização de dados h-CLAT combinados com outras informações (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. O método de ensaio h-CLAT demonstrou ser transferível para laboratórios com experiência em técnicas de cultura celular e análise por citometria de fluxo. O nível de reprodutibilidade esperado das previsões decorrentes do ensaio é da ordem dos 80 %, tanto intralaboratorial como interlaboratorial (3) (12). Os resultados do estudo de validação (13) e de outros estudos publicados (14) indicam, em termos gerais, que, comparativamente com os resultados obtidos pelo método LLNA, a precisão na distinção entre sensibilizantes cutâneos (cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 85 % (N=142), com uma sensibilidade de 93 % (94/101) e uma especificidade de 66 % (27/41), a partir de uma nova análise do EURL ECVAM (12), tendo em conta todos os dados existentes, mas excluindo os resultados negativos obtidos para produtos químicos com coeficiente de partição octanol-água (log P) superior a 3,5, conforme descrito no ponto 4. É mais provável que os falsos resultados negativos nas previsões efetuadas com o método h-CLAT digam respeito a produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo a moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que a produtos químicos com um potencial de sensibilização cutânea elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (4) (13) (15). No seu conjunto, estas informações demonstram a utilidade do método h-CLAT para a identificação dos perigos de sensibilização cutânea. No entanto, os valores relativos à precisão do método de ensaio h-CLAT utilizado isoladamente são meramente indicativos, uma vez que o presente método deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA, tal como outros ensaios que utilizam animais, pode não refletir de forma adequada a situação no ser humano.
4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o método h-CLAT é aplicável a produtos químicos em estudo que abrangem uma grande diversidade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potências de sensibilização cutânea (determinadas em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (3) (14) (15). O método é aplicável a produtos químicos solúveis ou que formem uma dispersão estável – ou seja, um coloide ou uma suspensão em que o produto em estudo não se deposite nem se separe do solvente/veículo formando diferentes fases – num solvente/veículo adequado (ver ponto 14). Os produtos químicos com log P superior a 3,5 tendem a produzir resultados negativos falsos (14). Por conseguinte, os resultados negativos obtidos com produtos químicos em estudo que apresentem um log P superior a 3,5 não devem ser tidos em conta. No entanto, os resultados positivos obtidos com produtos químicos em estudo que apresentem um log P superior a 3,5 poderão ser utilizados para ajudar a identificar o produto químico em estudo como sensibilizante cutâneo. Além disso, devido à limitada capacidade metabólica da linha celular utilizada (16) e às condições experimentais, os pró-haptenos (substâncias que requerem ativação enzimática, por exemplo através das enzimas P450) e os pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação), em particular os que apresentem uma taxa de oxidação lenta, podem também produzir resultados negativos no h-CLAT (15). É possível avaliar produtos químicos fluorescentes com o h-CLAT (17). No entanto, os produtos fortemente fluorescentes que emitem no mesmo comprimento de onda que o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou que o iodeto de propídio (IP) interferem com a deteção por citometria de fluxo, pelo que não podem ser corretamente avaliados utilizando anticorpos conjugados com FITC ou IP. Neste caso, é possível recorrer, respetivamente, a outros anticorpos marcados com fluorocromos ou a outros marcadores de citotoxicidade, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos dos anticorpos marcados com FITC (ver ponto 24) ou com IP (ver ponto 18), por exemplo testando as substâncias para demonstração de competência indicadas nos apêndices 1-2. À luz do que precede, os resultados negativos devem ser interpretados no contexto das limitações indicadas e em conjunto com outras fontes de informação no âmbito da IATA. Nos casos em que se demonstre que o método h-CLAT não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, o mesmo não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

5. Tal como descrito acima, o método h-CLAT ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. Porém, quando utilizado no âmbito de abordagens integradas do tipo IATA, pode também contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização (4) (5) (9). Contudo, é necessário continuar a trabalhar, de preferência com base em dados humanos, para determinar o modo como os resultados do h-CLAT poderão vir a ser úteis para este tipo de avaliação.
6. São apresentadas definições no apêndice 1.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O método h-CLAT é um ensaio *in vitro* que permite quantificar as variações da expressão de marcadores (CD86 e CD54) da superfície das células da linha celular da leucemia monocítica humana THP-1, após uma exposição de 24 horas ao produto químico em estudo. Estas moléculas de superfície são marcadores típicos da ativação dos monócitos THP-1 e podem imitar a ativação das células dendríticas, o que desempenha um papel crítico na ativação das células T. As variações na expressão dos marcadores de superfície são medidas por citometria de fluxo após coloração das células com anticorpos marcados com fluorocromo. A citotoxicidade é medida em paralelo, a fim de determinar se a ativação da expressão dos marcadores de superfície ocorre a concentrações subcitotóxicas. A intensidade relativa de fluorescência dos marcadores de superfície, em comparação com a do controlo do solvente/veículo, é calculada e utilizada no modelo preditivo (ver ponto 26), para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

8. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 1.2. Além disso, os utilizadores do ensaio devem manter uma base de dados históricos resultantes dos controlos de reatividade (ver ponto 11) e obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 20 a 22) e devem utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório se mantém ao longo do tempo.

PROCEDIMENTO

9. O presente método de ensaio baseia-se no protocolo n.º 158 do serviço de base de dados sobre os métodos alternativos à experimentação em animais (DB-ALM — DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation) h-CLAT (18), que é o protocolo utilizado para o estudo de validação coordenado pelo EURL ECVAM. Recomenda-se a utilização deste protocolo aquando da implementação e utilização, no laboratório, do método h-CLAT. Segue-se uma descrição dos principais elementos e procedimentos do método h-CLAT, que compreende duas etapas: um ensaio de determinação da dose e uma medição da expressão de CD86/CD54.

Preparação das células

10. Para a execução do método h-CLAT, deve utilizar-se a linha celular da leucemia monocítica humana, THP-1. Recomenda-se que as células (TIB-202™) sejam obtidas junto de um banco de células reconhecido, como a American Type Culture Collection.
11. As células THP-1 são cultivadas a 37°C numa atmosfera humidificada a 5 % CO₂, em meio RPMI-1640 complementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomina. A utilização da penicilina e da estreptomina no meio de cultura pode ser evitada. No entanto, nesse caso, os utilizadores devem verificar se a ausência de antibióticos no meio de cultura não tem qualquer impacto nos resultados, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2. De qualquer modo, para minimizar o risco de contaminação, devem seguir-se as boas práticas de cultura celular independentemente da presença ou não de antibióticos no meio de cultura celular. As células THP-1 são inoculadas regularmente a cada 2-3 dias, a uma densidade compreendida entre 0,1 e 0,2 × 10⁶ células/ml, e devem ser mantidas a uma densidade compreendida entre 0,1 e 1,0 × 10⁶ células/ml. Antes da sua utilização para o ensaio, as células devem ser qualificadas através de um controlo de reatividade. Este controlo deve ser realizado duas semanas após a descongelação, utilizando como controlos positivos o 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) (n.º CAS 97-00-7, pureza ≥ 99 %) e o sulfato de níquel (NiSO₄) (n.º CAS 10101-97-0, pureza ≥ 99 %) e como controlo negativo o ácido láctico (AL) (n.º CAS 50-21-5, pureza ≥ 85 %). Tanto o DNCB como o NiSO₄ devem dar respostas positivas para os marcadores de superfície celular CD86 e CD54; o ácido láctico deve dar uma resposta negativa para os marcadores de superfície celular CD86 e CD54. Apenas serão utilizadas para o ensaio as células que tenham passado o controlo de reatividade. As células podem ser propagadas até dois meses após a descongelação, sem ultrapassar as 30 passagens. O controlo de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 20 a 24.

12. Para o ensaio, as células THP-1 são inoculadas a uma densidade de $0,1 \times 10^6$ células/ml ou $0,2 \times 10^6$ células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante 72 horas ou 48 horas, respetivamente. É importante que a densidade celular no frasco de cultura imediatamente após o período de pré-cultura seja o mais coerente possível em cada experiência (utilizando uma das duas condições de pré-cultura acima descritas), uma vez que a densidade celular no frasco de cultura imediatamente após a pré-cultura pode influenciar a expressão de CD86/CD54 induzida por alérgenos (19). No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são novamente colocadas em suspensão num meio de cultura fresco a uma densidade de 2×10^6 células/ml. Em seguida, distribuem-se as células numa placa de 24 poços de fundo plano (500 μ l, 1×10^6 células/poço) ou numa placa de 96 poços de fundo plano (80 μ l, $1,6 \times 10^5$ células/poço).

Ensaio de determinação da dose

13. Efetua-se um *ensaio de determinação da dose* para apurar o valor CV75, ou seja, a concentração do produto químico em estudo que resulta numa viabilidade celular (CV) de 75 %, em comparação com o controlo do solvente/veículo. O valor CV75 é utilizado para determinar a concentração de produtos químicos em estudo a utilizar para a medição da expressão de CD86/CD54 (ver pontos 20 a 24).

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

14. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. No caso do método h-CLAT, os produtos químicos em estudo são dissolvidos ou dispersos de forma estável (ver também o ponto 4) escolhendo de preferência como solvente/veículo uma solução salina ou o meio ou, como segunda opção, dimetil-sulfóxido (DMSO, pureza ≥ 99 %), se o produto químico não for solúvel ou não formar uma dispersão estável nos dois solventes/veículos anteriores, até concentrações finais de 100 mg/ml (solução salina ou meio) ou de 500 mg/ml (DMSO). É possível utilizar solventes/veículos diferentes dos acima descritos, desde que a escolha seja suficientemente fundamentada do ponto de vista científico. Deve ter-se em conta a estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo final.
15. A partir das soluções-mãe dos produtos químicos em estudo a 100 mg/ml (em solução salina ou meio) ou a 500 mg/ml (em DMSO), devem efetuar-se as diluições seguintes:
- Se o solvente/veículo for a solução salina ou o meio: preparam-se oito soluções-mãe (oito concentrações) através de uma série de diluições de fator 2 utilizando o solvente/veículo correspondente. Estas soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 50 no meio de cultura (soluções de trabalho). Se a concentração final máxima de 1 000 μ g/ml na placa não for tóxica, a concentração máxima deve ser novamente determinada através da realização de um novo ensaio de citotoxicidade. A concentração final na placa não deve exceder 5 000 μ g/ml para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável na solução salina ou no meio.
 - Se o solvente/veículo for o DMSO: preparam-se oito soluções-mãe (oito concentrações) através de uma série de diluições de fator 2 utilizando o solvente/veículo correspondente. Estas soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 250 no meio de cultura (soluções de trabalho). A concentração final na placa, mesmo que não seja tóxica, não deve exceder 1 000 μ g/ml.

Para a exposição, utilizam-se, por fim, as soluções de trabalho, adicionando o mesmo volume de cada uma destas ao volume de células THP-1 em suspensão na placa (ver também o ponto 17), a fim de obter uma diluição suplementar de fator 2 (em geral, as concentrações finais na placa encontram-se no intervalo entre 7,81-1 000 μ g/ml).

16. O controlo do solvente/veículo utilizado no método h-CLAT é o meio de cultura (para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável (ver ponto 4) no meio ou na solução salina) ou o DMSO (para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável no DMSO) a uma concentração final única de 0,2 % na placa. Efetua-se uma diluição idêntica à descrita para as soluções de trabalho no ponto 15.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

17. O meio de cultura ou as soluções de trabalho, que se descrevem nos pontos 15 e 16, misturam-se na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões celulares preparadas na placa de 24 poços ou de 96 poços de fundo plano (ver ponto 12). As placas tratadas são, em seguida, incubadas durante $24 \pm 0,5$ horas a 37°C , 5 % CO_2 . Deve ter-se o cuidado de evitar a evaporação dos produtos químicos em estudo, caso sejam voláteis, e a contaminação cruzada entre poços pelos referidos produtos, por exemplo selando a placa antes da incubação com os produtos químicos em estudo (20).

Coloração com iodeto de propídio (IP)

18. Após $24 \pm 0,5$ horas de exposição, as células são transferidas para tubos de ensaio e recolhidas por centrifugação. Rejeitam-se os sobrenadantes e as restantes células são novamente colocadas em suspensão em 200 μl (no caso da placa de 96 poços) ou 600 μl (no caso da placa de 24 poços) de um tampão fosfato salino contendo 0,1 % de albumina de soro bovino (tampão de coloração). Transferem-se 200 μl da suspensão de células para uma placa de 96 poços de fundo redondo (no caso da placa de 96 poços) ou para um microtubo (no caso da placa de 24 poços); em seguida, as células são lavadas duas vezes com 200 μl (no caso da placa de 96 poços) ou 600 μl (no caso da placa de 24 poços) de tampão de coloração. Por último, as células são novamente suspensas no tampão de coloração (por exemplo, 400 μl), sendo acrescentada uma solução de IP (por exemplo, 20 μl) (para obter, por exemplo, uma concentração final de IP de 0,625 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Podem utilizar-se outros marcadores de citotoxicidade, tais como a 7-aminoactinomicina D (7-AAD), o azul de Trypan ou outros, desde que se possa demonstrar que produzem resultados semelhantes ao IP, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2.

Medição da citotoxicidade por citometria de fluxo e estimativa do valor CV75

19. O nível de fixação do IP é analisado por citometria de fluxo no canal FL-3. No total, são analisadas 10 000 células vivas (IP negativo). A viabilidade celular pode ser calculada pelo programa de análise do citómetro utilizando a equação indicada em baixo. Se a viabilidade celular for baixa, devem ser adquiridas, no máximo, 30 000 células, incluindo células mortas. Uma outra opção consiste em adquirir os dados durante um minuto após o início da análise.

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células adquiridas}} \times 100$$

O valor CV75 (ver ponto 13), isto é, a concentração que provoca 75 % de sobrevivência das células THP-1 (25 % de citotoxicidade), é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

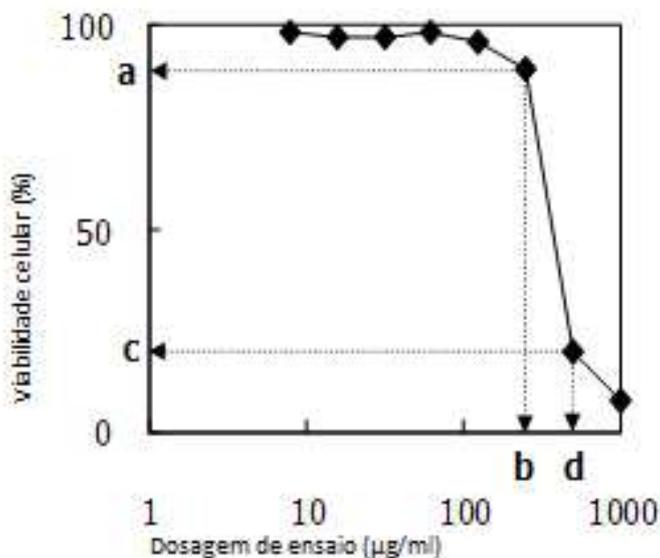
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

em que:

a é o valor mínimo de viabilidade celular superior a 75 %

c é o valor máximo de viabilidade celular inferior a 75 %

b e d são as concentrações que provocam os valores de viabilidade celular a e c, respetivamente



Podem utilizar-se outras abordagens para calcular o CV75, desde que fique demonstrado que tal não tem qualquer impacto nos resultados (por exemplo, testando as substâncias para demonstração de competência).

Medição da expressão de CD86/CD54

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

20. Utiliza-se o solvente/veículo adequado (solução salina, meio ou DMSO; ver o ponto 14) para dissolver os produtos químicos em estudo ou para criar uma dispersão estável. Os produtos químicos em estudo são primeiro diluídos até uma concentração correspondente a 100 vezes (na solução salina ou no meio) ou 500 vezes (no DMSO) o valor $CV75 \times 1,2$ determinado no *ensaio de determinação da dose* (ver ponto 19). Se o CV75 não puder ser determinado (ou seja, se a citotoxicidade observada no *ensaio de determinação da dose* for insuficiente), deve utilizar-se como concentração inicial a concentração solúvel ou em dispersão estável mais elevada do produto químico em estudo preparado com cada solvente/veículo. Note-se que a concentração final na placa não deve exceder 5 000 µg/ml (no caso da solução salina ou do meio) ou 1 000 µg/ml (no caso do DMSO). Seguidamente, são realizadas diluições em série de fator 1:2 utilizando o solvente/veículo correspondente para obter as soluções-mãe (oito concentrações entre $100 \times 1,2 \times CV75$ e $100 \times 0,335 \times CV75$ (na solução salina ou no meio) ou entre $500 \times 1,2 \times CV75$ e $500 \times 0,335 \times CV75$ (no DMSO)), que serão testadas de acordo com o método h-CLAT (ver o protocolo DB-ALM n.º 158 para um exemplo do esquema de dosagem). As soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 50 (solução salina ou meio) ou de 250 (DMSO) no meio de cultura (soluções de trabalho). Estas soluções de trabalho são finalmente utilizadas para exposição, após uma diluição final de fator 2 na placa. Se os resultados não satisfizerem os critérios de aceitação descritos nos pontos 29 e 30 quanto à viabilidade celular, pode repetir-se o ensaio de determinação da dose para deduzir um valor CV75 mais preciso. Note-se que apenas podem ser utilizadas placas de 24 poços para a medição da expressão de CD86/CD54.
21. O controlo do solvente/veículo é preparado conforme descrito no ponto 16. O controlo positivo utilizado no método h-CLAT é o DNCB (ver ponto 11), para o qual são preparadas soluções-mãe em DMSO e diluídas tal como descrito para as soluções-mãe no ponto 20. O DNCB deve ser utilizado como controlo positivo para a *medição da expressão de CD86/CD54* a uma concentração final única na placa (geralmente 4,0 µg/ml). Para obter uma concentração de 4,0 µg/ml de DNCB na placa, prepara-se uma solução-mãe de 2 mg/ml de DNCB em DMSO, que é depois novamente diluída por um fator de 250 no meio de cultura, até se obter uma solução de trabalho a 8 µg/ml. Em alternativa, pode utilizar-se o valor CV75 do DNCB, determinado em cada instalação de ensaio, como concentração do controlo positivo. Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução. Para os controlos positivos, a concentração final única na placa não deve exceder 5 000 µg/ml (no caso da solução salina ou meio) ou 1 000 µg/ml (no caso do DMSO). Os critérios de aceitação para a execução são idênticos aos descritos para o produto químico em estudo (ver ponto 29), exceto no que diz respeito ao último critério, uma vez que o controlo positivo é testado a uma concentração única.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

22. Para obter uma previsão, é necessária uma experiência para cada produto químico em estudo e para cada substância de controlo. Cada experiência consiste em pelo menos duas execuções independentes para a *medição de expressão de CD86/CD54* (ver pontos 26 a 28). Cada execução independente é efetuada num dia diferente ou no mesmo dia, desde que, para cada execução: a) sejam preparadas soluções-mãe e de trabalho frescas, independentes, do produto químico em estudo e soluções de anticorpos, e b) sejam utilizadas células colhidas em dois tempos independentes (provenientes de frascos de cultura diferentes); no entanto, as células podem ser provenientes da mesma passagem. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo preparados como soluções de trabalho (500 µl) são misturados com 500 µl de suspensão de células (1×10^6 células) a um rácio de 1:1 e as células são incubadas durante $24 \pm 0,5$ horas, conforme descrito nos pontos 20 e 21. Em cada execução, basta um único replicado para cada concentração do produto química em estudo e da substância de controlo, dado que a previsão é obtida a partir de, pelo menos, duas execuções independentes.

Coloração celular e análise

23. Após $24 \pm 0,5$ horas de exposição, as células são transferidas da placa de 24 poços para tubos de ensaio e recolhidas por centrifugação, antes de serem lavadas duas vezes com 1 ml de tampão de coloração (se necessário, podem ser efetuadas etapas de lavagem suplementares). Após a lavagem, as células são bloqueadas com 600 µl de solução de bloqueio [tampão de coloração com 0,01 % (m/v) de globulina (fração Cohn II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ou equivalente)] e incubadas a 4°C durante 15 minutos. Após o bloqueio, as células são divididas em três alíquotas de 180 µl numa placa de 96 poços de fundo redondo ou num microtubo.
24. Após centrifugação, as células são coradas a 4°C durante 30 minutos com 50 µl de anticorpos marcados com FITC anti-CD86, anti-CD54 ou de ratinho (isótipo) IgG1. Os anticorpos descritos no protocolo DB-ALM n.º 158 h-CLAT (18) devem ser diluídos no tampão de coloração a um rácio de 3:25 v/v [para CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1) ou de 3:50 v/v (para CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) e IgG1 (DAKO, #X0927)]. Estes rácios de

diluição dos anticorpos foram definidos aquando do desenvolvimento do ensaio como aqueles que apresentam a melhor relação sinal/ruído. A experiência adquirida aquando do desenvolvimento do ensaio indica que a intensidade da fluorescência dos anticorpos é geralmente coerente entre diferentes lotes. No entanto, os utilizadores podem ponderar a possibilidade de proceder à titulação dos anticorpos em condições laboratoriais próprias, a fim de definir as concentrações mais adequadas. Podem ser utilizados anticorpos anti-CD86 e/ou anti-CD54 marcados por outros fluorocromos, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos anticorpos conjugados por FITC, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2. Note-se que a alteração do clone ou do fornecedor dos anticorpos, tal como descrito no protocolo DB-ALM n.º 158 h-CLAT (18), pode afetar os resultados. Após terem sido lavadas duas ou mais vezes com 150 µl de tampão de coloração, as células são novamente colocadas em suspensão no tampão de coloração (por exemplo, 400 µl), sendo acrescentada a solução de IP (por exemplo, 20 µl para obter uma concentração final de 0,625 µg/ml) ou um outro marcador de citotoxicidade (ver ponto 18). Os níveis de expressão de CD86 e de CD54 e a viabilidade celular são analisados por citometria de fluxo.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

25. O nível de expressão de CD86 e CD54 é analisado por citometria de fluxo com o canal de aquisição FL-1. Com base na média geométrica da intensidade de fluorescência (IMF, intensidade média de fluorescência), a intensidade relativa de fluorescência (IRF) de CD86 e de CD54 para as células com controlo (ctrl) positivo e para as células tratadas com o produto químico é calculada utilizando a seguinte equação:

$$RFI = \frac{MFI \text{ cél. tratadas com prod. quím.} - MFI \text{ cél. ctrl do isótipo tratadas com prod. quím.}}{MFI \text{ cél. ctrl do isótipo tratadas solvente/veículo} - MFI \text{ cél. ctrl do isótipo tratadas solvente/veículo}} \times 100$$

A viabilidade celular das células de controlo (ctrl) do isótipo [coradas com anticorpos de ratinho IgG1 (isótipo)] também é calculada de acordo com a equação descrita no ponto 19.

Modelo preditivo

26. Para determinar a expressão de CD86/CD54, cada produto químico em estudo é testado em, pelo menos, duas execuções independentes para obter uma previsão única (POSITIVA ou NEGATIVA). Uma previsão por h-CLAT é considerada POSITIVA se for preenchida pelo menos uma das seguintes condições em duas de duas ou em pelo menos duas de três execuções independentes; caso contrário, a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA (figura 1):
- A IRF de CD86 é igual ou superior a 150 % a qualquer concentração testada (com viabilidade celular \geq 50 %);
 - A IRF de CD54 é igual ou superior a 200 % a qualquer concentração testada (com viabilidade celular \geq 50 %).
27. Atendendo ao que precede, se as duas primeiras execuções forem ambas positivas para CD86 e/ou forem ambas positivas para CD54, a previsão por h-CLAT é considerada POSITIVA e não é necessário efetuar uma terceira execução. Do mesmo modo, se as duas primeiras execuções forem negativas para ambos os marcadores, a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA (tendo devidamente em conta o disposto no ponto 30), não sendo necessário efetuar uma terceira execução. Se, no entanto, as duas primeiras execuções não forem concordantes em relação a pelo menos um dos marcadores (CD54 ou CD86), é necessário realizar uma terceira execução e a previsão final basear-se-á no resultado obtido na maioria das três execuções individuais (ou seja, dois de três). A este respeito, importa notar que, se forem efetuadas duas execuções independentes e uma só for positiva para CD86 (a seguir designada P₁) e a outra só for positiva para CD54 (a seguir designada P₂), é necessário realizar uma terceira execução. Se esta terceira execução for negativa para ambos os marcadores (a seguir designada N), a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA. Em contrapartida, se a terceira execução for positiva para um dos marcadores (P₁ ou P₂) ou para ambos os marcadores (a seguir designada P₁₂), a previsão por h-CLAT é considerada POSITIVA.

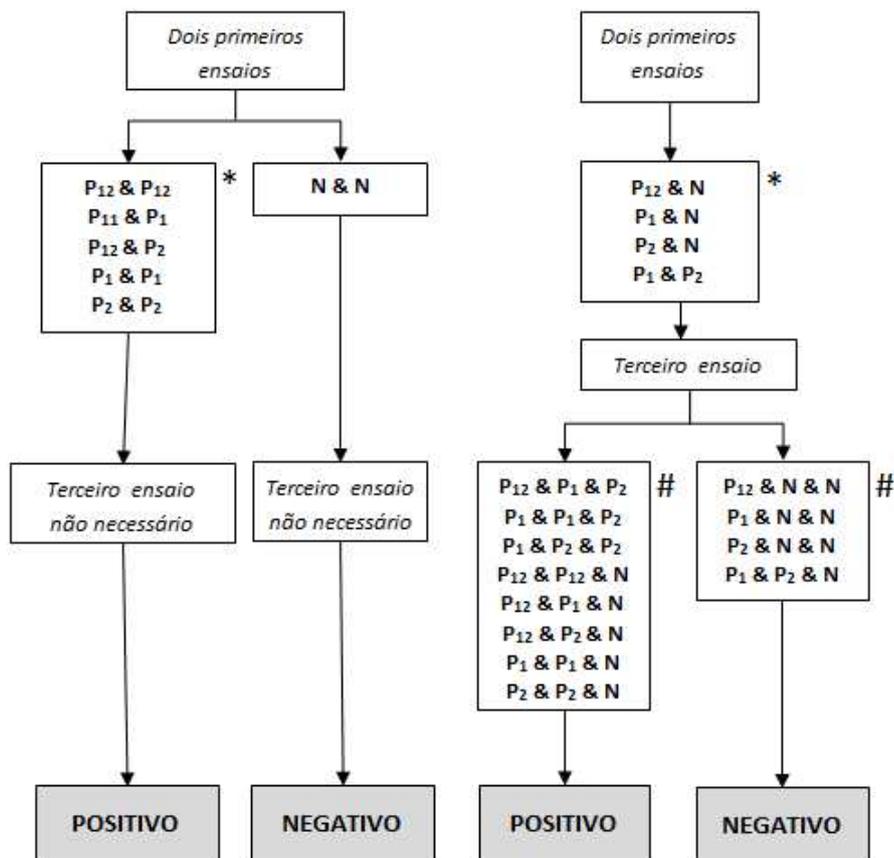


Figura 1: Modelo preditivo usado no método h-CLAT. Uma previsão por h-CLAT deve ser analisada no âmbito de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral.

P₁: execução positiva apenas para CD86; P₂: execução positiva apenas para CD54; P₁₂: execução positiva para CD86 e CD54; N: execução não positiva para CD86 nem para CD54.

* As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das duas primeiras execuções, independentemente da ordem de obtenção dos resultados.

As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das três execuções com base nos resultados obtidos nas duas primeiras execuções indicados na caixa acima, mas não refletem a ordem de obtenção dos resultados.

28. No caso dos produtos químicos em estudo que se prevê sejam POSITIVOS com o h-CLAT, podem determinar-se dois valores de concentração efetiva (CE), CE150 para CD86 e CE200 para CD54, ou seja, a concentração à qual os produtos químicos em estudo produzem uma IRF de 150 ou 200. Estes valores CE podem contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização (9) no âmbito de uma abordagem integrada do tipo IATA (4) (5) (6) (7) (8). Podem ser calculados utilizando as seguintes equações:

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}] \times (A_{conc} - B_{conc})$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}] \times (A_{conc} - B_{conc})$$

em que

A_{conc} é a concentração mais baixa em µg/ml com IRF > 150 (CD86) ou 200 (CD54)

B_{conc} é a concentração mais elevada em µg/ml com IRF < 150 (CD86) ou 200 (CD54)

A_{IRF} é a IRF à concentração mais baixa com IRF > 150 (CD86) ou 200 (CD54)

B_{IRF} é a IRF à concentração mais elevada com IRF < 150 (CD86) ou 200 (CD54)

Para determinar de modo mais preciso os valores CE150 e CE200, podem ser necessárias três execuções independentes para a *medição da expressão de CD86/CD54*. Os valores CE150 e CE200 finais são, então, determinados como o valor mediano das CE calculado a partir das três execuções independentes. Se apenas duas das três execuções independentes satisfizerem os critérios de positividade (ver pontos 26 e 27), é adotado o valor CE150 ou CE200 mais elevado.

Crítérios de aceitação

29. Os critérios de aceitação a seguir indicados devem ser respeitados ao utilizar o método h-CLAT (22) (27).
- Os valores de viabilidade celular dos controlos do meio e do solvente/veículo devem ser superiores a 90 %.
 - Para o controlo do solvente/veículo, as IRF de CD86 e de CD54 não devem exceder os critérios positivos (CD86 IRF \geq 150 % e CD54 IRF \geq 200 %). Os valores de IRF para o controlo do solvente/veículo são calculados utilizando a fórmula indicada no ponto 25 (substituindo a menção «IMF do produto químico» por «IMF do solvente/veículo» e «IMF do solvente/veículo» por «IMF do controlo (meio)»).
 - Para o controlo do meio e do solvente/veículo, os rácios da IMF CD86 e CD54 para o controlo de isotipo devem ser $>$ 105 %.
 - Para o controlo positivo (DNCB), os valores IRF de CD86 e de CD54 devem cumprir os critérios positivos (CD86 IRF \geq 150 e CD54 IRF \geq 200) e a viabilidade celular deve ser superior a 50 %.
 - Para o produto químico em estudo, a viabilidade celular deve ser superior a 50 % em, pelo menos, quatro concentrações testadas em cada execução.
30. Os resultados negativos só são aceitáveis no caso de produtos químicos em estudo que apresentem uma viabilidade celular inferior a 90 % à concentração mais elevada testada (ou seja, $1,2 \times CV75$ de acordo com o esquema de diluições em série descrito no ponto 20). Se a viabilidade celular a $1,2 \times CV75$ for igual ou superior a 90 %, o resultado negativo não deve ser tido em conta. Neste caso, é recomendável tentar aperfeiçoar a seleção das doses repetindo a determinação do valor CV75. Note-se que, quando uma concentração de 5 000 $\mu\text{g/ml}$ na solução salina (ou no meio ou outros solventes/veículos), uma concentração de 1 000 $\mu\text{g/ml}$ em DMSO ou a concentração solúvel mais elevada é utilizada como concentração máxima de ensaio para um produto químico em estudo, pode aceitar-se um resultado negativo mesmo que a viabilidade celular seja superior a 90 %.

Relatório de ensaio

31. O relatório de ensaio deve incluir as informações que a seguir se indicam.

Produto químico em estudo

Substância monocomponente

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, log P, solubilidade na água, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;
- Aspeto físico, solubilidade na água, solubilidade em DMSO e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;
- Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Controlos

Controlo positivo

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, log P, água, solubilidade na água, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas e se aplicável;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação da execução, se aplicável.

Controlo negativo e controlo do solvente/veículo

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes caso seja utilizado um solvente/veículo diferente dos mencionados nas orientações de ensaio, na medida em que estejam disponíveis;
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

- Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;
- Descrição do ensaio utilizado;
- Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);
- Citometria de fluxo utilizada (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, globulina, anticorpos e marcador de citotoxicidade utilizados;
- O procedimento utilizado para demonstrar a competência do laboratório na realização do ensaio, mediante o teste de substâncias para demonstração de competência, e o procedimento utilizado para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo, por exemplo dados históricos do controlo e/ou dados históricos dos controlos de reatividade.

Critérios de aceitação do ensaio

- Viabilidade celular, valores IMF e IRF obtidos com o controlo do solvente/veículo comparativamente com os intervalos de aceitação;
- Viabilidade celular e valores IRF obtidos com o controlo positivo comparativamente com os intervalos de aceitação;
- Viabilidade celular de todas as concentrações testadas do produto químico em estudo.

Procedimento de ensaio

- Número de execuções realizadas;
- Concentrações do produto químico em estudo, aplicação e tempo de exposição utilizado (se diferente do recomendado);
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

- Quadro com os dados, incluindo o valor CV75 (se aplicável), a IMF geométrica individual, a IRF, valores de viabilidade celular, valores CE150/CE200 (se aplicável) obtidos para o produto químico em estudo e para o controlo positivo em cada execução, bem como uma indicação da classificação do produto químico em estudo segundo o modelo preditivo;
- Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o método h-CLAT;
- Análise dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso estejam disponíveis outras informações pertinentes.

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767-773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Disponível em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.
- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.

- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol*. DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Disponível em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Disponível em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Disponível em: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 70-82.

- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, França, 2005, 96 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Apêndice 1.1

DEFINIÇÕES

AOP (Adverse Outcome Pathway – via determinante dos efeitos nocivos): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (22).

CE150: Concentrações que apresentam IRF de 150 para a expressão de CD86.

CE200: Concentrações que apresentam IRF de 200 para a expressão de CD54.

Citometria de fluxo: Técnica citométrica em que células em suspensão num fluido passam, uma a uma, por um foco de excitação luminosa, disperso em padrões característicos das células e dos seus componentes; as células são frequentemente marcadas com marcadores fluorescentes para que a luz seja primeiro absorvida e depois emitida a uma frequência diferente.

Controlo do meio: Replicado não tratado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio. Esta amostra é tratada com amostras tratadas com o produto químico em estudo e outras amostras de controlo, para determinar se o solvente/veículo interage com o sistema de ensaio.

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/veículo interage com o sistema de ensaio.

CV75: Concentração estimada que apresenta uma viabilidade celular de 75 %.

Ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido (21).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (21).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo em simultâneo com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (21).

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment* – abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

Intensidade relativa de fluorescência (IRF): Valores relativos da média geométrica da intensidade de fluorescência (IMF) das células tratadas com o produto químico em comparação com a IMF das células tratadas com o solvente/veículo.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (21).

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (21).

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (21).

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Sistema 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 dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (23).

Substância: Um elemento químico e seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e quaisquer impurezas resultantes do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem alterar a sua composição.

Substância monocomponente: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais do que um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes é que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Tampão de coloração: Uma solução salina de tampão fosfato com 0,1 % de albumina de soro bovino.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Apêndice 1.2

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo corretamente a previsão esperada com o método h-CLAT para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores CV75, CE150 e CE200 que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem o conjunto de respostas possíveis no que diz respeito aos perigos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o método h-CLAT. Além disso, estão disponíveis dados de referência publicados para o método h-CLAT (3) (14).

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o método h-CLAT

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão <i>in vivo</i> (1)	Intervalo de referência CV75 em µg/ml (2)	Resultados h-CLAT para CD86 (intervalo de referência CE150 em µg/ml) (2)	Resultados h-CLAT para CD54 (intervalo de referência CE200 em µg/ml) (2)
2,4-Dinitroclorobenzeno	97-00-7	Sólido	Sensibilizante (extremo)	2-12	Positivo (0,5-10)	Positivo (0,5-15)
4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	Sensibilizante (forte)	5-95	Positivo (< 40)	Negativo (> 1,5) (3)
Sulfato de níquel	10101-97-0	Sólido	Sensibilizante (moderado)	30-500	Positivo (< 100)	Positivo (10-100)
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sólido	Sensibilizante (moderado)	30-400	Negativo (> 10) (3)	Positivo (10-140)
R(+)-Limoneno	5989-27-5	Líquido	Sensibilizante (fraco)	> 20	Negativo (> 5) (3)	Positivo (< 250)
Imidazolidinilureia	39236-46-9	Sólido	Sensibilizante (fraco)	25-100	Positivo (20-90)	Positivo (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Não sensibilizante	> 5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Glicerol	56-81-5	Líquido	Não sensibilizante	> 5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	Não sensibilizante	1500-5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Ácido 4-aminobenzoico	150-13-0	Sólido	Não sensibilizante	> 1 000	Negativo (> 1 000)	Negativo (> 1 000)

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

(1) A previsão de perigo (e potência) *in vivo* baseia-se em dados LLNA (3) (14). A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (24).

(2) Com base em valores históricos observados (13) (25).

(3) Historicamente, a maioria dos resultados negativos foi obtida para este marcador, pelo que se espera, em grande parte, um resultado negativo. O intervalo indicado foi definido com base nos poucos resultados positivos históricos observados. Se for obtido um resultado positivo, o valor CE deve situar-se dentro do intervalo de referência indicado.

Apêndice 2

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: TESTE DE ATIVAÇÃO DA LINHA CELULAR U937 (U-SENS™)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. O método de ensaio U-SENS™ permite quantificar as variações na expressão de um marcador de superfície celular associadas ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas (ou seja, CD86), na linha celular do linfoma histiocítico humano U937, após a exposição a sensibilizantes (1). Os níveis de expressão medidos para o marcador de superfície celular CD86 na linha celular U937 são, em seguida, utilizados para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.
2. O método de ensaio U-SENS™ foi avaliado num estudo de validação (2) coordenado pela L'Oréal, seguido de uma análise independente pelos pares conduzida pelo Comité Científico Consultivo (ESAC) do Laboratório de Referência da União Europeia para as Alternativas à Experimentação em Animais (EURL ECVAM) (3). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o método de ensaio U-SENS™ foi recomendado pelo EURL ECVAM (4) para ser utilizado no âmbito de uma IATA para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. No seu documento de orientação relativo à elaboração de relatórios sobre as abordagens estruturadas de integração de dados e de utilização de fontes individuais de informação no âmbito de uma IATA para a sensibilização cutânea, a OCDE analisa atualmente vários estudos de casos que descrevem diferentes estratégias de ensaio e modelos preditivos. Uma das diferentes abordagens definidas baseia-se no ensaio U-SENS (5). Encontram-se na literatura (4) (5) (7) exemplos da utilização de dados U-SENS™ combinados com outras informações, incluindo dados históricos e dados humanos válidos (6).
3. O método de ensaio U-SENS™ demonstrou ser transferível para laboratórios com experiência em técnicas de cultura celular e análise por citometria de fluxo. O nível de reprodutibilidade esperado das previsões efetuadas pelo ensaio é da ordem dos 90 % intralaboratorial e 84 % interlaboratorial (8). Os resultados do estudo de validação (8) e de outros estudos publicados (1) indicam, em termos gerais, que, em comparação com os resultados obtidos pelo método LLNA, a precisão na distinção entre sensibilizantes cutâneos (cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 86 % (N=166), com uma sensibilidade de 91 % (118/129) e uma especificidade de 65 % (24/37). Em comparação com os resultados obtidos no ser humano, a precisão na distinção entre sensibilizantes (cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 77 % (N=101), com uma sensibilidade de 100 % (58/58) e uma especificidade de 47 % (20/43). É mais provável que os falsos negativos nas previsões efetuadas com o método U-SENS™ em comparação com o LLNA digam respeito a produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo a moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que a produtos químicos com um potencial de sensibilização cutânea elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (1) (8) (9). No seu conjunto, estas informações demonstram a utilidade do método U-SENS™ para a identificação dos perigos de sensibilização cutânea. No entanto, os valores relativos à precisão do ensaio U-SENS™ utilizado isoladamente são meramente indicativos, uma vez que o presente método deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a situação no ser humano.
4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o método U-SENS™ é aplicável a produtos químicos em estudo (incluindo ingredientes cosméticos, tais como conservantes, tensoativos, substâncias ativas, corantes) abrangendo diversos grupos funcionais orgânicos, propriedades físico-químicas, potência de sensibilização cutânea (tal como determinadas por estudos *in vivo*) e o espectro de mecanismos de reação que se sabe estarem associados à sensibilização cutânea (ou seja, aceitador de Michael, formação de base de Schiff, agente acilante, substituição nucleófila bimolecular [SN2] ou substituição nucleófila aromática [SNAr]) (1) (8) (9) (10). O método de ensaio U-SENS™ é aplicável a produtos químicos que sejam solúveis ou que formem uma dispersão estável (ou seja, um coloide ou uma suspensão em que o produto químico não se deposite nem se separe do solvente/veículo formando diferentes fases) num solvente/veículo adequado (ver ponto 13). Os produtos químicos constantes da base de dados assinalados como pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação) ou pró-haptenos (substâncias que requerem ativação enzimática, por exemplo através de enzimas P450) foram corretamente previstos pelo ensaio U-SENS™ (1) (10). As substâncias capazes de provocar a rutura de membranas podem produzir resultados falsos positivos, devido a um aumento não específico da expressão de CD86. Com efeito, três dos sete falsos positivos em relação à classificação de referência

in vivo eram sensíveis (1). Por isso, os resultados positivos com sensíveis devem ser tratados com prudência, enquanto os resultados negativos com sensíveis podem continuar a ser utilizados para apoiar a identificação do produto químico em estudo como não sensibilizante. É possível avaliar produtos químicos em estudo fluorescentes com o U-SENS™ (1). No entanto, os produtos fortemente fluorescentes que emitem no mesmo comprimento de onda que o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou que o iodeto de propídio (IP) provocam interferência com a deteção por citometria de fluxo, pelo que não podem ser corretamente avaliados utilizando anticorpos conjugados com FITC (potenciais falsos negativos) ou IP (viabilidade não mensurável). Neste caso, é possível recorrer, respetivamente, a outros anticorpos marcados com fluorocromos ou a outros marcadores de citotoxicidade, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos dos anticorpos marcados com FITC ou com IP (ver ponto 18), por exemplo testando as substâncias para demonstração de competência indicadas no apêndice 2.2. À luz do que precede, os resultados positivos com sensíveis e os resultados negativos com produtos químicos em estudo fortemente fluorescentes devem ser interpretados no contexto das limitações indicadas e em conjunto com outras fontes de informação no âmbito da IATA. Nos casos em que seja demonstrado que o ensaio U-SENS™ não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, este ensaio não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

5. Tal como descrito acima, o ensaio U-SENS™ ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. No entanto, quando utilizado no âmbito de abordagens integradas do tipo IATA, pode também contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização. Contudo, é necessário continuar a trabalhar, de preferência com base em dados humanos, para determinar o modo como os resultados do U-SENS™ poderão vir a ser úteis para este tipo de avaliação.
6. Apresentam-se definições no apêndice 2.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O método U-SENS™ é um ensaio *in vitro* que permite quantificar as variações da expressão do marcador de superfície celular CD86 numa linha celular do linfoma histiocítico humano – as células U937 – após uma exposição de 45 ± 3 horas ao produto químico em estudo. O marcador de superfície CD86 é um marcador típico de ativação das células U937. Trata-se de uma molécula de coestimulação conhecida por ser capaz de simular a ativação monocitária, o que desempenha um papel crítico na ativação das células T. As variações na expressão do marcador de superfície celular CD86 são medidas por citometria de fluxo após coloração das células, geralmente com anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A citotoxicidade é medida em paralelo (por exemplo, utilizando IP), a fim de determinar se a ativação da expressão do marcador de superfície celular CD86 ocorre a concentrações subcitotóxicas. O índice de estimulação (IE) do marcador de superfície celular CD86, em comparação com o do controlo do solvente/veículo, é calculado e utilizado no modelo preditivo (ver ponto 19) para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

8. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 2.2, em conformidade com as boas práticas para os métodos *in vitro* (11). Além disso, os utilizadores do ensaio devem manter uma base de dados históricos dos controlos de reatividade (ver ponto 11), obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 15 e 16), e utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório é mantida ao longo do tempo.

PROCEDIMENTO

9. O presente método de ensaio baseia-se no protocolo n.º 183 do serviço de base de dados sobre os métodos alternativos à experimentação em animais (DB-ALM — *DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation*) U-SENS™ (12). Devem utilizar-se procedimentos operacionais normalizados (PON) aquando da implementação e utilização do método de ensaio U-SENS™ em laboratório. Pode utilizar-se um sistema automatizado para executar o método de ensaio U-SENS™ se for possível demonstrar que produz resultados semelhantes, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. Segue-se uma descrição dos principais elementos e procedimentos do método U-SENS™.

Preparação das células

10. Para a realização do ensaio U-SENS™, deve utilizar-se a linha celular do linfoma histiocítico humano, U937 (13). As células (clone CRL1593.2) devem ser obtidas junto de um banco de células reconhecido, como a American Type Culture Collection.
11. As células U937 são cultivadas a 37 °C numa atmosfera humidificada a 5 % CO₂, em meio RPMI-1 640 complementado com 10 % de soro fetal de vitelo (SFV), 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (meio completo). As células U937 são passadas regularmente a cada 2-3 dias a uma densidade de 1,5 ou 3 × 10⁵ células/ml, respetivamente. A densidade celular não deve exceder 2 × 10⁶ células/ml e a viabilidade celular medida pela exclusão do azul de Trypan deve ser ≥ 90 % (não deve aplicar-se na primeira passagem após descongelação). Antes de ser utilizado para o ensaio, cada lote de células, de SFV ou de anticorpos deve ser qualificado mediante a realização de um controlo de reatividade. O controlo de reatividade das células deve ser efetuado com o controlo positivo, o ácido picrilsulfónico (ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico: TNBS) (n.º CAS 2 508-19-2, pureza ≥ 99 %) e com o controlo negativo, o ácido láctico (n.º CAS 50-21-5, pureza ≥ 85 %), pelo menos uma semana após a descongelação. O controlo de reatividade deve ser efetuado com seis concentrações finais para cada um dos dois controlos (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml e ácido láctico: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). O TNBS dissolvido no meio completo deve produzir uma resposta positiva para o CD86, relacionada com a concentração (por exemplo, quando uma concentração positiva, IE CD86 ≥ 150, é seguida por uma concentração com um IE CD86 crescente); o ácido láctico dissolvido no meio completo deve produzir uma resposta negativa para o CD86 (ver ponto 21). Apenas devem ser utilizados para o ensaio os lotes de células que tenham passado duas vezes o controlo de reatividade. As células podem ser propagadas até sete semanas após a descongelação. O número de passagens não deve exceder 21. O controlo de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 18 a 22.
12. Para o ensaio, as células U937 são inoculadas a uma densidade de 3 × 10⁵ células/ml ou 6 × 10⁵ células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante dois dias ou um dia, respetivamente. Podem utilizar-se condições de pré-cultura diferentes das descritas acima, desde que a escolha seja suficientemente fundamentada do ponto de vista científico e seja possível demonstrar que produz resultados semelhantes, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são novamente colocadas em suspensão num meio de cultura fresco a uma densidade de 5 × 10⁵ células/ml. Em seguida, distribuem-se as células numa placa de 96 poços de fundo plano com 100 µl (densidade celular final de 0,5 × 10⁵ células/poço).

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

13. A avaliação da solubilidade deve ser efetuada antes do ensaio. Para este efeito, os produtos químicos em estudo são dissolvidos ou dispersos de forma estável a uma concentração de 50 mg/ml, escolhendo de preferência como solvente o meio completo ou, como segunda opção de solvente/veículo, o dimetilsulfóxido (DMSO, pureza ≥ 99 %), se o produto químico em estudo não for solúvel no meio completo. Para o ensaio, dissolve-se o produto químico em estudo até uma concentração final de 0,4 mg/ml no meio completo, se o produto químico for solúvel neste solvente/veículo. Se apenas for solúvel em DMSO, é dissolvido a uma concentração de 50 mg/ml. É possível utilizar solventes/veículos diferentes dos descritos, desde que a escolha seja fundamentada do ponto de vista científico. Deve ser tida em conta a estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo final.
14. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. Uma vez que não é realizado um ensaio de determinação da dose, devem testar-se, para a primeira execução, seis concentrações finais (1, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml) no solvente/veículo correspondente, quer no meio completo, quer em DMSO a 0,4 % no meio. Para as execuções seguintes, partindo das soluções do produto químico em estudo a uma concentração de 0,4 mg/ml em meio completo, ou de 50 mg/ml em DMSO, preparam-se pelo menos quatro soluções de trabalho (ou seja, pelo menos quatro concentrações) utilizando o solvente/veículo correspondente. Para terminar, as soluções de trabalho são utilizadas para o tratamento, acrescentando um volume igual de células U937 em suspensão (ver ponto 11 *supra*) ao volume da solução de trabalho na placa para obter uma diluição suplementar de fator 2 (12). As concentrações (pelo menos quatro) para eventuais execuções suplementares são selecionadas com base nos resultados individuais de todas as execuções anteriores (8). As concentrações finais utilizáveis são 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µg/ml. A concentração final máxima é de 200 µg/ml. Se for obtido um valor positivo para CD86 a 1 µg/ml, convém avaliar 0,1 µg/ml para encontrar a concentração do produto químico em estudo que não transpõe o limiar de positividade de CD86. Para cada execução, calcula-se o valor CE150 (concentração à qual um produto químico atinge o limiar de positividade de

150 % para CD86, ver ponto 19) se for observada uma resposta positiva para CD86 dependente da concentração. Se o produto químico em estudo induzir uma resposta positiva para CD86 não relacionada com a concentração, o cálculo do valor CE150 pode não ser pertinente, tal como descrito no protocolo DB-ALM n.º 183 U-SENS™ (12). Para cada execução, é calculado, sempre que possível, o valor CV70 (concentração à qual um produto químico atinge o limiar de citotoxicidade de 70 %, ver ponto 19) (12). Para avaliar o efeito de resposta ligada à concentração do aumento de CD86, quaisquer concentrações escolhidas entre as concentrações utilizáveis devem ser repartidas uniformemente entre a CE150 (ou a concentração mais elevada não citotóxica negativa para CD86) e a CV70 (ou a concentração mais elevada permitida, ou seja, de 200 µg/ml). Para efeitos de comparação, devem testar-se, no mínimo, quatro concentrações por execução sendo, pelo menos, duas concentrações comuns à execução ou execuções anteriores.

15. O controlo do solvente/veículo utilizado no ensaio U-SENS™ é o meio completo – para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável no meio completo, ver ponto 4 – ou o DMSO a 0,4 % em meio completo – para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável em DMSO.
16. O controlo positivo utilizado no ensaio U-SENS™ é o TNBS (ver ponto 11), preparado em meio completo. O TNBS deve ser utilizado como controlo positivo para a medição da expressão de CD86 a uma concentração final única na placa (50 µg/ml) que produza uma viabilidade celular > 70 %. Para obter uma concentração de 50 µg/ml de TNBS na placa, prepara-se uma solução-mãe de TNBS a 1 M (ou seja, 293 mg/ml) em meio completo, antes de proceder a uma diluição por um fator de 2 930 no meio completo até se obter uma solução de trabalho a 100 µg/ml. O ácido láctico (AL, CAS 50-21-5) deve ser utilizado como controlo negativo, dissolvido a 200 µg/ml no meio completo, a partir de uma solução-mãe a 0,4 mg/ml. Em cada placa de cada execução, preparam-se três replicados de meio completo controlo não tratado, o controlo do solvente/veículo e os controlos negativo e positivo (12). Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução. Os critérios de aceitação da execução são idênticos aos descritos para o produto químico em estudo (ver ponto 12).

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

17. O controlo do solvente/veículo ou as soluções de trabalho descritas nos pontos 14 a 16 são misturados na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões de células preparadas na placa de 96 poços de fundo plano (ver ponto 12). As placas tratadas são, em seguida, incubadas durante 45 ± 3 horas a 37 °C, 5 % CO₂. Antes da incubação, as placas são seladas com uma membrana semipermeável, para evitar a evaporação de produtos químicos em estudo voláteis e a contaminação cruzada entre células tratadas com os produtos químicos em estudo (12).

Coloração celular

18. Após 45 ± 3 horas de exposição, as células são transferidas para uma placa de microtitulação de fundo cónico e recolhidas por centrifugação. A interferência de solubilidade é definida pela presença de cristais ou gotas visíveis ao microscópio 45 ± 3 horas após o tratamento (antes da coloração celular). Os sobrenadantes são rejeitados e as restantes células são lavadas uma vez com 100 µl de um tampão fosfato salino (TFS) gelado contendo 5 % de soro fetal de vitelo (tampão de coloração). Após centrifugação, as células são novamente colocadas em suspensão em 100 µl de tampão de coloração e coradas com 5 µl (ou seja, 0,25 µg) de anticorpos anti-CD86 ou anticorpos de ratinho (isótipo) IgG1 marcados com FITC a 4 °C durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Devem utilizar-se os anticorpos descritos no protocolo DB-ALM n.º 183 U-SENS™ (12) (para CD86: BD-PharMingen #5556 57 Clone: Fun-1, ou Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63; e para IgG1: BD-PharMingen #5557 48, ou Caltag/Invitrogen # GM4992). A experiência adquirida aquando do desenvolvimento do ensaio indica que a intensidade da fluorescência dos anticorpos é geralmente coerente entre diferentes lotes. É possível utilizar para o ensaio outros clones ou fornecedor dos anticorpos que tenham passado o controlo de reatividade (ver o ponto 11). No entanto, os utilizadores podem ponderar a possibilidade de proceder à titulação dos anticorpos em condições laboratoriais próprias, a fim de definir a concentração mais adequada. Podem utilizar-se outros sistemas de deteção, por exemplo anticorpos

anti-CD86 marcados por outros fluorocromos, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos anticorpos conjugados por FITC, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. Após duas lavagens com 100 µl de tampão de coloração e uma lavagem com 100 µl de TFS gelado, as células são novamente colocadas em suspensão em TFS gelado (por exemplo, 125 µl para as amostras a analisar manualmente tubo a tubo, ou 50 µl para uma placa de auto-amostragem) e acrescenta-se a solução de IP (concentração final: 3 µg/ml). Podem utilizar-se outros marcadores de citotoxicidade, tais como a 7-aminoactinomicina D (7-AAD) ou o azul de Trypan, desde que se possa demonstrar que produzem resultados semelhantes ao IP, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2.

Análise por citometria de fluxo

19. O nível de expressão de CD86 e a viabilidade celular são analisados por citometria de fluxo. As células são dispostas num gráfico de pontos à escala logarítmica de acordo com o seu tamanho (FSC) e granularidade (CSS), a fim de identificar claramente a população numa primeira janela R1 e eliminar os resíduos. O objetivo consiste em adquirir 10 000 células na janela R1 para cada poço. As células pertencentes a uma mesma janela R1 são representadas num gráfico de pontos FL3 ou FL4/CSS. As células viáveis são identificadas traçando uma segunda janela R2 de seleção da população celular negativa para o iodeto de propídio (canais FL3 ou FL4). Pode calcular-se a viabilidade celular pelo programa de análise do citómetro utilizando a equação indicada em baixo. Se a viabilidade celular for baixa, devem ser adquiridas, no máximo, 20 000 células, incluindo células mortas. Uma outra opção consiste em adquirir os dados durante um minuto após o início da análise.

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células adquiridas}} \times 100$$

A percentagem das células FL1-positivas é, em seguida, medida entre as células viáveis retidas em R2 (dentro de R1). A expressão de CD86 na superfície celular é analisada através de um gráfico de pontos FL1/CSS em células viáveis (R2).

No caso dos poços que contêm meio completo/IgG1, o marcador de análise é fixado próximo da população principal, de modo a que os controlos em meio completo apresentem um valor IgG1 na zona alvo de 0,6 a 0,9 %.

A interferência de cor é definida como uma transferência da dispersão correspondente aos IgG1 marcados com FITC (médio geométrica de IE IgG1 FL1 \geq 150 %).

O índice de estimulação (IE) de CD86 para as células de controlo (não tratadas ou em DMSO a 0,4 %) e para as células tratadas com produtos químicos é calculado pela seguinte equação:

$$S.I. = \frac{\% \text{ de células tratadas CD86}^+ - \% \text{ de células tratadas IgG1}^+}{\% \text{ de células de controlo CD86}^+ - \% \text{ de células de controlo IgG1}^+} \times 100$$

% de células de controlo não tratadas IgG1⁺: percentagem de células FL1-positivas reconhecidas pelo IgG1 que ultrapassam o marcador de análise (intervalo de aceitação \geq 0,6 % e $<$ 1,5 %, ver ponto 22) entre as células viáveis não tratadas.

% de células de controlo IgG1⁺/células tratadas CD86⁺: percentagem de células FL1-positivas reconhecidas pelo IgG1/CD86 medida sem deslocar o marcador de análise, entre as células viáveis de controlo/tratadas.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

20. Os parâmetros seguintes são calculados no ensaio U-SENS™: valor CV70, isto é, a concentração que produz uma sobrevivência de 70 % das células U937 (30 % de citotoxicidade) e o valor CE150, ou seja, a concentração à qual os produtos químicos em estudo induzem um índice de estimulação (IE) de CD86 de 150 %.

O valor CV70 é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

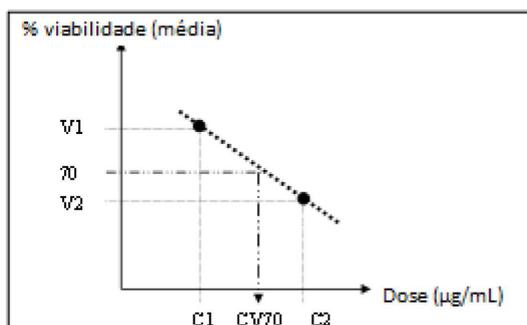
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

em que:

V1 é o valor mínimo de viabilidade celular superior a 70 %

V2 é o valor máximo de viabilidade celular inferior a 70 %

C1 e C2 são as concentrações que provocam os valores de viabilidade celular V1 e V2, respetivamente.



Podem ser utilizadas outras abordagens para calcular o valor CV70, desde que fique demonstrado que tal não tem qualquer impacto nos resultados – por exemplo, testando as substâncias para demonstração de competência.

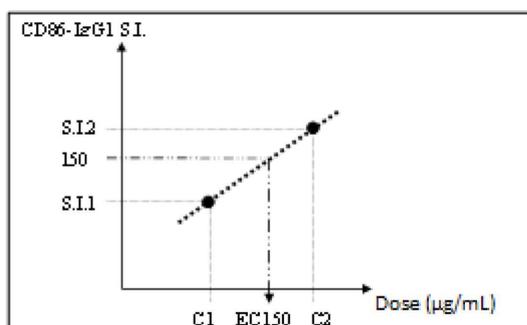
O valor CE150 é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

$$CE150 = C1 + [(150 - IE 1) / (IE 2 - IE 1) * (C2 - C1)]$$

Em que:

C1 é a concentração mais elevada em µg/ml com um IE CD86 < 150 % (IE 1)

C2 é a concentração mais baixa em µg/ml com um IE CD86 ≥ 150 % (IE 2)



Os valores CE150 e CV70 são calculados

- para cada execução: os valores CE150 e CV70 são utilizados como ferramentas para investigar o efeito de resposta ligada à concentração do aumento de CD86 (ver ponto 14);
- o valor CV70 global é determinado em função da viabilidade média (12);
- o valor CE150 global de um produto químico em estudo que se preveja POSITIVO com o ensaio U-SENS™ é determinado em função dos valores médios de IE CD86 (ver ponto 21) (12).

Modelo preditivo

21. Para a medição de expressão CD86, cada produto químico em estudo é testado em, pelo menos, quatro concentrações e em, pelo menos, duas execuções independentes (efetuadas em dias diferentes) para chegar a uma previsão única (NEGATIVO ou POSITIVO).
 - A conclusão individual de uma execução do ensaio U-SENS™ é considerada negativa (a seguir designada por N) se o IE de CD86 for inferior a 150 % a todas as concentrações não citotóxicas (viabilidade celular ≥ 70 %) e se não for observada nenhuma interferência (citotoxicidade, solubilidade: ver ponto 18, ou cor: ver ponto 19, independentemente das concentrações não citotóxicas às quais a interferência é detetada). Em todos os outros casos (para um IE de CD86 superior ou igual a 150 % e/ou interferências observadas), a conclusão individual de uma execução do ensaio U-SENS™ é considerada positiva, sendo a seguir designada por P.
 - Uma previsão U-SENS™ é considerada NEGATIVA se, pelo menos, duas execuções independentes forem negativas (N) (figura 1). Se as duas primeiras execuções forem negativas (N), a previsão U-SENS™ é considerada NEGATIVA e não é necessário proceder a uma terceira execução.
 - Uma previsão U-SENS™ é considerada POSITIVA se, pelo menos, duas execuções independentes forem positivas (P) (figura 1). Se as duas primeiras execuções forem positivas (P), a previsão U-SENS™ é considerada POSITIVA e não é necessário proceder a uma terceira execução.
 - Uma vez que não é realizado um ensaio de determinação da dose, há uma exceção se, na primeira execução, o IE de CD86 for superior ou igual a 150 % apenas à concentração não citotóxica mais elevada. Neste caso, a execução é considerada INCONCLUSIVA (NC), devendo testar-se, em execuções suplementares, concentrações adicionais (entre a concentração mais elevada não citotóxica e a concentração mais baixa citotóxica — ver ponto 20). Se uma execução for identificada como NC, convém realizar pelo menos duas execuções suplementares, e uma quarta execução caso os resultados das execuções 2 e 3 não sejam concordantes (N e/ou P, a título independente) (figura 1). As execuções seguintes serão consideradas positivas mesmo que apenas uma das concentrações não citotóxicas dê um valor de CD86 superior ou igual a 150 %, uma vez que os parâmetros de concentração foram adaptados especificamente a este produto químico em estudo. A previsão final basear-se-á no resultado maioritário das três ou quatro execuções individuais (ou seja, 2 de 3 ou 2 de 4) (figura 1).

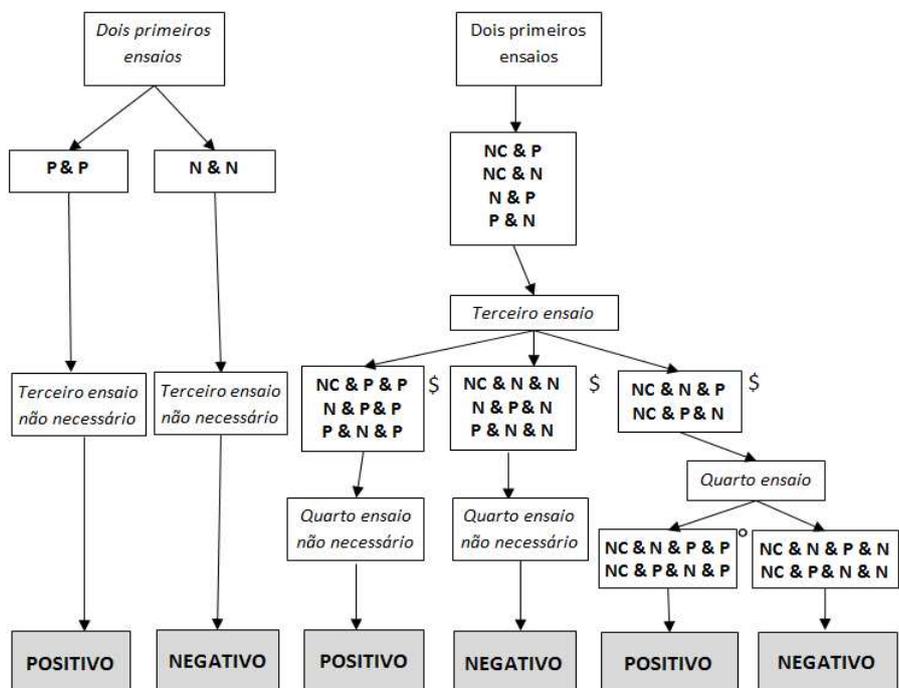


Figura 1: Modelo preditivo utilizado no ensaio U-SENS™. Uma previsão por U-SENS™ deve ser considerada no âmbito de uma IATA e em conformidade com o disposto no ponto 4 e nos pontos 7, 8 e 9 da Introdução Geral.

N: Execução sem resultado positivo para CD86 nem interferência observada.

P: Execução com resultado positivo para CD86 e/ou interferência(s) observada(s).

NC: Inconclusivo. Primeira execução inconclusiva se CD86 for positivo apenas à concentração não citotóxica mais elevada.

#: Um resultado individual inconclusivo (NC) atribuído apenas aquando da primeira execução requer automaticamente uma terceira execução para chegar a uma maioria de conclusões positivas (P) ou negativas (N) em pelo menos duas de três execuções independentes.

§: As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das três execuções com base nos resultados obtidos nas duas primeiras execuções indicados na caixa acima.

°: As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das quatro execuções com base nos resultados obtidos nas três primeiras execuções indicados na caixa acima.

Crítérios de aceitação

22. Ao utilizar o método de ensaio U-SENS™ devem respeitar-se os critérios de aceitação a seguir indicados (12).

- Após uma exposição de 45 ± 3 horas, a viabilidade média dos três replicados de células U937 não tratadas deve ser $> 90\%$ e não deve observar-se qualquer deriva da expressão de CD86. A expressão basal de CD86 nas células U937 não tratadas deve estar compreendida entre $\geq 2\%$ e $\leq 25\%$.
- Se o solvente utilizado for o DMSO, a sua validade como controlo do veículo é avaliada calculando o IE do DMSO em comparação com o das células não tratadas, devendo a viabilidade média dos três replicados de células ser $> 90\%$. O controlo de veículo DMSO é válido se o IE médio de CD86 nos três replicados de DMSO for inferior a 250% do IE médio de CD86 nos três replicados de células U937 não tratadas.
- As execuções são consideradas válidas se, pelo menos, dois dos três valores IgG1 das células U937 não tratadas forem $\geq 0,6\%$ e $< 1,5\%$.
- O controlo negativo testado em paralelo (ácido láctico) é considerado válido se, pelo menos, dois dos três replicados forem negativos (IE CD86 $< 150\%$) e não citotóxicos (viabilidade celular $\geq 70\%$).
- O controlo positivo (TNBS) é considerado válido se pelo menos dois dos três replicados forem positivos (IE CD86 $\geq 150\%$) e não citotóxicos (viabilidade celular $\geq 70\%$).

Relatório de ensaio

23. O relatório de ensaio deve incluir as informações indicadas a seguir.

Produto químico em estudo

Substância monocomponente

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

- Aspeto físico, solubilidade no meio completo, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;
- Aspeto físico, solubilidade no meio completo, solubilidade em DMSO e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;
- Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Controlos

Controlo positivo

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas, se conhecidas e se pertinente;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

- Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação da execução, se aplicável.

Controlo negativo e controlo do solvente/veículo

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas pertinentes, caso seja utilizado um solvente/veículo diferente dos mencionados nas orientações de ensaio, na medida em que estejam disponíveis;
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

- Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;
- Descrição do método de ensaio utilizado;
- Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);
- Citometria de fluxo utilizada (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, anticorpos e marcador de citotoxicidade utilizados;
- Procedimento utilizado para demonstrar as competências do laboratório na realização do ensaio, mediante o teste de substâncias para demonstração de competência, e procedimento utilizado para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo, por exemplo dados históricos do controlo e/ou dados históricos dos controlos de reatividade.

Critérios de aceitação do ensaio

- Viabilidade celular e valores IE CD86 obtidos com o controlo do solvente/veículo, em comparação com os intervalos de aceitação;
- Viabilidade celular e valores IE obtidos com o controlo positivo, em comparação com os intervalos de aceitação;
- Viabilidade celular de todas as concentrações testadas do produto químico em estudo.

Procedimento de ensaio

- Número de execuções realizadas;
- Concentrações do produto químico em estudo, aplicação e tempo de exposição utilizado (se diferente do recomendado);
- Duração da exposição,

- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

- Quadro com os dados, incluindo o valor CV70 (se pertinente), IE, valores de viabilidade celular, valores CE150 (se pertinente) obtidos para o produto químico em estudo e para o controlo positivo em cada execução, bem como uma indicação da classificação do produto químico em estudo segundo o modelo preditivo;
- Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o método U-SENS™;
- Análise dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso se disponha de outras informações pertinentes.

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Disponível em: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Disponível em: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Disponível em: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].

- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Disponível em: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruxelas. Disponível em: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Apêndice 2.1

DEFINIÇÕES

AOP (Adverse Outcome Pathway – via determinante dos efeitos nocivos): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (15).

CV70: Concentração estimada que apresenta uma viabilidade celular de 70 %.

Deriva: A deriva é definida pelo seguinte i) valor corrigido %CD86⁺ do replicado 3 do controlo não tratado é inferior a 50 % da média corrigida do valor %CD86⁺ dos replicados 1 e 2 do controlo não tratado; e ii) valor corrigido %CD86⁺ do replicado 3 do controlo negativo é inferior a 50 % da média corrigida do valor %CD86⁺ dos replicados 1 e 2 do controlo negativo.

CE150: Concentrações estimadas que apresentam um IE de 150 % para a expressão de CD86.

Citometria de fluxo: Técnica citométrica na qual células em suspensão num fluido passam, uma a uma, por um foco de excitação luminosa, disperso em padrões característicos das células e dos seus componentes; as células são frequentemente marcadas com marcadores fluorescentes, para que a luz seja primeiro absorvida e depois emitida a uma frequência diferente.

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/veículo interage com o sistema de ensaio.

Ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido (14).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (14).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo simultaneamente com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios, utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (14).

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment – abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

IE: Índice de estimulação. Valores relativos da média geométrica da intensidade de fluorescência das células tratadas com o produto químico em comparação com as células tratadas com o solvente.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (14).

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (14).

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica, por exemplo por oxidação.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método.

Resposta de CD86 ligada à concentração: O efeito é dependente da concentração (ou resposta ligada à concentração) quando uma concentração positiva ($IE_{CD86} \geq 150$) é seguida de uma concentração com um IE_{CD86} ainda maior.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (14).

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS) Sistema 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 dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (16).

Substância: Um elemento químico e seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e quaisquer impurezas resultantes do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem alterar a sua composição.

Substância monocomponente: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais do que um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes é que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Tampão de coloração: Uma solução salina de tampão fosfato com 5 % de soro fetal de vitelo.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Apêndice 2.2

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo corretamente a previsão esperada com o método U-SENS™ para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores CV70 e CE150 que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem o conjunto de respostas possíveis no que diz respeito aos perigos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o método U-SENS™. Além disso, estão disponíveis dados de referência publicados para o método U-SENS™ (1) (8).

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o método U-SENS™

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão <i>in vivo</i> (1)	U-SENS Solvente/Veículo	U-SENS Intervalo de referência CV70 em µg/ml (2)	U-SENS Intervalo de referência CE150 em µg/ml (2)
4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	Sensibilizante (forte)	Meio completo (3)	< 30	Positivo (≤ 10)
Ácido picrilsulfónico	2508-19-2	Líquido	Sensibilizante (forte)	Meio completo	> 50	Positivo (≤ 50)
Maleato de dietilo	141-05-9	Líquido	Sensibilizante (moderado)	DMSO	10-100	Positivo (≤ 20)
Resorcinol	108-46-3	Sólido	Sensibilizante (moderado)	Meio completo	> 100	Positivo (≤ 50)
Álcool cinâmico	104-54-1	Sólido	Sensibilizante (fraco)	DMSO	> 100	Positivo (10-100)
4-Alilanol	140-67-0	Líquido	Sensibilizante (fraco)	DMSO	> 100	Positivo (< 200)
Sacarina	81-07-2	Sólido	Não sensibilizante	DMSO	> 200	Negativo (> 200)
Glicerol	56-81-5	Líquido	Não sensibilizante	Meio completo	> 200	Negativo (> 200)
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	Não sensibilizante	Meio completo	> 200	Negativo (> 200)
Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	Não sensibilizante	DMSO	> 200	Negativo (> 200)

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

(1) A previsão de perigo (e potência) *in vivo* baseia-se em dados LLNA (1) (8). A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (17).

(2) Com base em valores históricos observados (1) (8).

(3) Meio completo: meio RPMI-1640 complementado com 10 % de soro fetal de vitelo, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (8).

Apêndice 3

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO: ENSAIO IL-8 LUC

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. Ao contrário dos ensaios que visam analisar o nível de expressão de marcadores de superfície celular, o ensaio IL-8 Luc permite quantificar as variações da expressão da IL-8, uma citocina associada à ativação das células dendríticas. Na linha celular repórter IL-8 derivada da linha celular THP-1 (THP-G8, estabelecida a partir da linha celular da leucemia monocítica aguda humana THP-1), a expressão da IL-8 é medida após exposição a sensibilizantes (1). O nível de expressão da luciferase é, depois, utilizado para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.
2. O ensaio IL-8 Luc foi objeto de um estudo de validação (2) realizado pelo Centro Japonês para a Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM), pelo **Ministério da Economia, do Comércio e da Indústria** (METI) e pela Sociedade Japonesa **para Alternativas à Experimentação em Animais (JSAAE)**, seguido de uma análise independente pelos pares (3) sob os auspícios do JaCVAM e do Ministério da Saúde, do Trabalho e da Segurança Social (MHLW), com o apoio da **Cooperação Internacional em matéria de Métodos de Ensaio** Alternativos (ICATM — International Cooperation on Alternative Test Methods). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o ensaio IL-8 Luc é considerado útil no âmbito de uma IATA para distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes, para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. As referências bibliográficas contêm exemplos da utilização de dados do ensaio IL-8 Luc combinados com outras informações (4) (5) (6).
3. O ensaio IL-8 Luc demonstrou ser transferível para laboratórios experientes em cultura celular e na medição da luciferase. O nível de reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial foi de 87,7 % e 87,5 %, respetivamente. Os dados obtidos com o estudo de validação (2) e outros estudos publicados (1) (6) demonstram que, em comparação com o método LLNA, o ensaio IL-8 Luc permitiu efetuar uma previsão positiva ou negativa para 118 de 143 produtos químicos, produziu resultados inconclusivos para 25 produtos químicos e apresenta uma precisão de 86 % (101/118), uma sensibilidade de 96 % (92/96) e uma especificidade de 41 % (9/22) para a distinção entre os produtos químicos sensibilizantes cutâneos (categoria 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes (sem categoria, de acordo com o GHS da ONU/CLP). Excluindo as substâncias que não são abrangidas pelo âmbito de aplicação descrito *infra* (ponto 5), o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 113 de 136 produtos químicos como positivos ou negativos e 23 produtos químicos como inconclusivos. A precisão do ensaio IL-8 Luc é de 89 % (101/113), com uma sensibilidade de 96 % (92/96) e uma especificidade de 53 % (9/17). Utilizando os dados humanos citados em Urbisch *et al.* (7), o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 76 de 90 produtos químicos como positivos ou negativos e 14 produtos químicos como inconclusivos, com uma precisão de 80 % (61/76), uma sensibilidade de 93 % (54/58) e uma especificidade de 39 % (7/18). Excluindo as substâncias que não são abrangidas pelo seu âmbito de aplicação, o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 71 de 84 produtos químicos como positivos ou negativos e 13 produtos químicos como inconclusivos, com uma precisão de 86 % (61/71), uma sensibilidade de 93 % (54/58) e uma especificidade de 54 % (7/13). É mais provável que ocorram falsos negativos nas previsões efetuadas com o ensaio IL-8 Luc com produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo/moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que com produtos químicos com um potencial elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (6). No seu conjunto, estas informações corroboram o papel do ensaio do IL-8 Luc na identificação dos perigos de sensibilização cutânea. Os valores relativos à precisão do método de ensaio IL-8 Luc utilizado isoladamente servem apenas de orientação, uma vez que o presente método deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a situação no ser humano.
4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o ensaio IL-8 Luc é aplicável a produtos químicos em estudo que abrangem uma grande diversidade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potências de sensibilização cutânea (determinadas em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (2) (6).

5. Embora utilize o solvente X-VIVO™ 15, o ensaio IL-8 Luc permite avaliar corretamente os produtos químicos com $\log P > 3,5$ e os produtos químicos com uma solubilidade na água de cerca de 100 µg/ml, tal como calculado com o programa EPI Suite™. Além disso, o seu desempenho para detetar sensibilizantes com fraca solubilidade na água é superior ao do ensaio IL-8 Luc utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente (2). No entanto, os resultados negativos obtidos com produtos químicos em estudo não dissolvidos a 20 mg/ml podem ser falsos negativos, devido à sua incapacidade para se dissolverem no X-VIVO™ 15. Por conseguinte, para estes produtos químicos, os resultados negativos não devem ser tidos em conta. No estudo de validação, observou-se uma elevada taxa de falsos negativos para os anidridos. Além disso, devido à capacidade metabólica limitada da linha celular utilizada (8) e às condições experimentais, os pró-haptenos (substâncias que requerem ativação metabólica) e os pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação) podem produzir resultados negativos no ensaio. No entanto, embora os resultados negativos obtidos com potenciais pré-haptenos ou pró-haptenos devam ser interpretados com prudência, o método IL-8 Luc permitiu identificar corretamente 11 de 11 pré-haptenos, 6/6 pró-haptenos e 6/8, pré-/pró-haptenos, no conjunto de dados do ensaio IL-8 Luc (2). O exame completo recentemente efetuado de três métodos de ensaio sem experimentação animal (o DPRA, o KeratinoSens™ e o h-CLAT) para detetar pré-haptenos e pró-haptenos (9) e o facto de as células THP-G8 utilizadas no ensaio IL-8 Luc serem uma linha celular derivada da THP-1, utilizada no método h-CLAT, permitem concluir que o ensaio IL-8 Luc, combinado com outros métodos, pode contribuir igualmente para melhorar a sensibilidade dos métodos sem recurso a animais na deteção de pré-haptenos e pró-haptenos. Os tensoativos testados até à data deram resultados positivos falsos, independentemente da sua tipologia (catiônicos, aniônicos ou não iónicos). Por último, os produtos químicos que interferem com a luciferase podem alterar a sua atividade/medição, provocando uma inibição aparente ou um aumento da luminescência (10). Por exemplo, foi notificado que concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 µM interferem com sinais de luminescência noutros ensaios por gene repórter da luciferase, devido à sobreativação do gene repórter da luciferase. Por conseguinte, a expressão da luciferase obtida na presença de concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de compostos suspeitos de ativar o gene repórter da luciferase de modo similar deve ser examinada com prudência (11). Atendendo ao que precede, os tensoativos, os anidridos e os produtos químicos que interferem com a luciferase são excluídos do âmbito de aplicação do presente ensaio. Nos casos em que seja demonstrado que o ensaio IL-8 Luc não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, este ensaio não deve ser utilizado para essas categorias específicas.
6. Tal como descrito acima, o ensaio IL-8 Luc ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. É necessário prosseguir os trabalhos, de preferência com base em dados humanos, para determinar se os resultados do IL-8 Luc poderão contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização cutânea quando considerados em combinação com outras fontes de informação.
7. São apresentadas definições no apêndice 3.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

8. O método de ensaio IL-8 Luc utiliza uma linha celular da leucemia monocítica humana, THP-1, obtida junto da American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). A partir desta linha celular, o Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Tohoku desenvolveu a linha celular repórter IL-8, derivada da THP-1, a THP-G8, que contém os genes da luciferase laranja (Stable Luciferase Orange, SLO) e vermelha (Stable Luciferase Red, SLR), sob o controlo dos promotores da IL-8 e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), respetivamente (1). Este sistema permite quantificar a indução do gene da luciferase por deteção da luminescência produzida por substratos de luciferase conhecidos pela sua emissão luminosa como indicador da atividade da IL-8 e da GAPDH nas células após a exposição a produtos químicos sensibilizantes.
9. O sistema de ensaio bicolor inclui uma luciferase emissora de laranja (SLO; $\lambda_{\text{máx.}} = 580 \text{ nm}$) (12) para a expressão genética do promotor da IL-8, bem como uma luciferase emissora de vermelho (SLR; $\lambda_{\text{máx.}} = 630 \text{ nm}$) (13) para a expressão genética do promotor do controlo interno, GAPDH. As duas luciferases emitem cores diferentes quando reagem à d-luciferina de pirilampo e a sua luminescência é medida simultaneamente aquando de uma reação numa só etapa, dividindo a emissão proveniente da mistura do ensaio com o auxílio de um filtro ótico (14) (apêndice 3.2).

10. As células THP-G8 são tratadas durante 16 horas com o produto químico em estudo, após o que a atividade da luciferase SLO (SLO-LA), indicativa da atividade do promotor da IL-8, e da luciferase SLR (SLR-LA), indicativa da atividade do promotor da GAPDH, são medidas. Para facilitar a compreensão das abreviaturas, SLO-LA e SLR-LA são designadas, respetivamente, por IL8LA e GAPLA. O quadro 1 apresenta uma descrição dos termos associados à atividade da luciferase no ensaio IL-8 Luc. Os valores medidos são utilizados para calcular a IL8LA normalizado (nIL8LA), ou seja, o rácio IL8LA/GAPLA; a indução da nIL8LA (Ind-IL8LA), que é o rácio entre a média aritmética dos quatro valores medidos da nIL8LA das células THP-G8 tratadas com o produto químico em estudo e os valores da nIL8LA das células THP-G8 não tratadas; e a inibição da GAPLA (Inh-GAPLA), que é o rácio entre a média aritmética dos quatro valores medidos da GAPLA das células THP-G8 tratadas com um produto químico em estudo e os valores da GAPLA das células THP-G8 não tratadas, e é utilizada como indicador de citotoxicidade.

Quadro 1

Descrição dos termos associados à atividade da luciferase no ensaio IL-8 Luc

Abreviaturas	Definição
GAPLA	Atividade da luciferase SLR indicativa da atividade do promotor da GAPDH
IL8LA	Atividade da luciferase SLO indicativa da atividade do promotor da IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos/nIL8LA das células não tratadas
Inh-GAPLA	GAPLA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos/GAPLA das células não tratadas
CV05	A concentração mais baixa do produto químico à qual a Inh-GAPLA passa a ser < 0,05.

11. Estão disponíveis normas de desempenho (15) que permitem facilitar a validação de métodos de ensaio *in vitro* modificados utilizando ensaios IL-8 da luciferase semelhantes ao ensaio IL-8 Luc, bem como modificar rapidamente as orientações de ensaio 442E da OCDE para que passem a incluir os referidos métodos. A aceitação mútua de dados (AMD) da OCDE só será garantida para métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho, se esses métodos tiverem sido examinados e incluídos nas orientações de ensaio 442E pela OCDE (16).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

12. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 3.3, em conformidade com as boas práticas para os métodos *in vitro* (17). Além disso, os utilizadores do ensaio devem conservar uma base de dados históricos resultantes dos controlos de reatividade (ver ponto 15), obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 21 a 24), e utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório se mantém ao longo do tempo.

PROCEDIMENTO

13. O procedimento operacional normalizado (PON) para o ensaio IL-8 Luc está disponível e deve ser utilizado para a realização do ensaio (18). Os laboratórios que desejem aplicar este ensaio podem obter a linha celular recombinante THP-G8 junto do laboratório GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão, após a assinatura de um acordo de transferência de

material, em conformidade com as condições enunciadas no modelo de acordo da OCDE. Os pontos que se seguem apresentam uma descrição dos principais elementos e procedimentos do ensaio.

Preparação das células

14. Convém utilizar a linha celular THP-G8 do laboratório GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão, para realizar o ensaio IL-8 Luc (ver pontos 8 e 13). Após a receção, as células são propagadas (2-4 passagens) e armazenadas congeladas, como uma reserva homogénea. As células desta reserva podem ser propagadas até um máximo de 12 passagens ou um máximo de seis semanas. O meio utilizado para a propagação é o meio de cultura RPMI-1640 com 10 % de soro bovino fetal (SBF), uma solução antibiótica/antimicótica (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B numa solução salina a 0,85 %) (por exemplo, GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml de puromicina (por exemplo, n.º CAS 58-58-2) e 300 µg/ml de G418 (por exemplo, n.º CAS 108321-42-2).
15. Antes da utilização para o ensaio, as células devem ser qualificadas através de um controlo de reatividade. Esta verificação deve ser efetuada uma a duas semanas ou duas a quatro passagens após descongelação, utilizando como controlo positivo o brometo de 4-nitrobenzilo (4-NBB) (n.º CAS: 100-11-8, pureza ≥ 99 %) e como controlo negativo o ácido láctico (AL) (n.º CAS: 50-21-5, pureza ≥ 85 %). O 4-NBB deve produzir uma resposta positiva para Ind-IL8LA (≥ 1,4), ao passo que o ácido láctico deve produzir uma resposta negativa para Ind-IL8LA (< 1,4). Apenas são utilizadas para o ensaio células que tenham passado o controlo de reatividade. O controlo de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 22 a 24.
16. Para o ensaio, as células THP-G8 são inoculadas a uma densidade de $2 \text{ a } 5 \times 10^5$ células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante 48 a 96 horas. No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são lavadas com RPMI-1640 contendo 10 % de SBF sem antibióticos e, em seguida, colocadas novamente em suspensão com RPMI-1640 contendo 10 % de SBF sem antibióticos a 1×10^6 células/ml. Em seguida, as células são distribuídas por uma placa negra de 96 poços de fundo plano (por exemplo, Costar Cat#3603) com 50 µl (5×10^4 de células/poço).

Preparação do produto químico em estudo e das substâncias de controlo

17. O produto químico em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. Para o ensaio IL-8 Luc, os produtos químicos em estudo são dissolvidos em X-VIVO™ 15, um meio isento de soro comercialmente disponível (Lonza, 04-418Q), até atingir uma concentração final de 20 mg/ml. O meio X-VIVO™ 15 é adicionado, num tubo de microcentrífuga, a 20 mg de produto químico em estudo (independentemente da solubilidade deste), até atingir um volume de 1 ml e, em seguida, é misturado vigorosamente num vórtex e agitado num rotor a uma velocidade máxima de 8 rpm durante 30 minutos a uma temperatura ambiente de cerca de 20 °C. Além disso, se os produtos químicos sólidos continuarem por dissolver, o tubo é sonificado até à dissolução completa do produto químico ou até à obtenção de uma dispersão estável. No caso de produtos químicos solúveis em X-VIVO™ 15, a solução é diluída por um fator de 5 no X-VIVO™ 15 e utilizada como solução-mãe do produto químico em estudo no X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). No caso de produtos químicos não solúveis em X-VIVO™ 15, a mistura é novamente misturada por rotação durante pelo menos 30 minutos, e depois centrifugada a 15000 rpm ($\approx 20000g$) durante 5 minutos; o sobrenadante é utilizado como solução-mãe do produto químico em estudo no X-VIVO™ 15. Caso sejam utilizados outros solventes, como DMSO, água ou o meio de cultura, a escolha deve ser fundamentada cientificamente. O procedimento pormenorizado para a dissolução dos produtos químicos é descrito no apêndice 3.5. As soluções X-VIVO™ 15 descritas nos pontos 18 a 23 são misturadas na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões de células preparadas numa placa negra de 96 poços de fundo plano (ver ponto 16).
18. A primeira execução do ensaio destina-se a determinar a concentração citotóxica e a examinar o potencial de sensibilização cutânea dos produtos químicos. Utilizando o X-VIVO™ 15, são efetuadas diluições em série, de fator 2, das soluções-mãe dos produtos químicos em estudo no X-VIVO™ 15 (ver apêndice 3.5) utilizando um bloco de ensaio de 96 poços (por exemplo, Costar Cat#EW-01729-03). Em seguida, acrescentam-se 50 µl/poço de solução diluída a 50 µl das células em suspensão numa placa negra de 96 poços de fundo plano. Assim, no caso de produtos químicos solúveis em X-VIVO™ 15, as concentrações finais dos produtos químicos em estudo variam entre 0,002 e 2 mg/ml (apêndice 3.5). No caso dos produtos químicos em estudo que não são solúveis em X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml, apenas são determinados fatores de diluição entre 2 e 2^{10} , apesar de as concentrações finais reais dos produtos químicos em estudo se manterem incertas e dependerem da concentração saturada dos produtos químicos em estudo na solução-mãe X-VIVO™ 15.

19. Nas execuções seguintes (isto é, o segundo, o terceiro e o quarto replicados), a solução-mãe X-VIVO™ 15 é preparada a uma concentração quatro vezes superior à concentração de viabilidade celular 05 (CV05; a concentração mais baixa à qual a Inh-GAPLA passa a ser $< 0,05$) observada na primeira experiência. Se a Inh-GAPLA não descer abaixo dos 0,05 à concentração mais elevada na primeira execução, a solução-mãe X-VIVO™ 15 é preparada à concentração mais elevada da primeira execução. A concentração CV05 é calculada dividindo a concentração da solução-mãe da primeira execução pelo fator de diluição de CV05 (X) (fator de diluição CV05 (X); o fator de diluição necessário para diluir a solução-mãe até alcançar o valor CV05) (ver apêndice 3.5). Para as substâncias em estudo não solúveis em X-VIVO a 20 mg/ml, o valor CV05 é determinado pela concentração da solução-mãe $\times 1/X$. Para as execuções 2 a 4, prepara-se uma segunda solução-mãe a uma concentração de $4 \times CV05$ (apêndice 3.5).
20. Efetuam-se diluições em série das segundas soluções-mãe do X-VIVO™ 15 por um fator de 1,5 utilizando um bloco de ensaio de 96 poços. Em seguida, acrescentam-se 50 μ l/poço de solução diluída a 50 μ l da suspensão de células nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano. Cada concentração de cada produto químico em estudo deve ser testada em 4 poços. As amostras são, em seguida, misturadas num agitador de placas e incubadas durante 16 horas a 37 °C e 5 % CO₂, após o que a atividade da luciferase é determinada, como se descreve em seguida.
21. O controlo do solvente é a mistura de 50 μ l/poço de X-VIVO™ 15 e de 50 μ l/poço da suspensão de células no RPMI-1640 contendo 10 % de SBF.
22. O controlo positivo recomendado é o 4-NBB. A 20 mg de 4-NBB preparados num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, é acrescentado X-VIVO™ 15 até atingir 1 ml. O tubo é misturado num vórtex vigorosamente e agitado num rotor a uma velocidade máxima de 8 rpm durante, pelo menos, 30 minutos. Após centrifugação a 20000 g durante 5 minutos, o sobrenadante é diluído por um fator de 4 no X-VIVO™ 15 e 500 μ l do sobrenadante diluído são transferidos para um poço num bloco de ensaio de 96 poços. O sobrenadante diluído é novamente diluído em X-VIVO™ 15 por fatores de 2 e de 4 e, em seguida, são adicionados 50 μ l da solução a 50 μ l de suspensão de células THP-G8 nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano (apêndice 3.6). Cada concentração do controlo positivo deve ser testada em 4 poços. A placa é agitada num agitador de placas e incubada numa incubadora de CO₂ durante 16 horas (37 °C, 5 % CO₂), após o que a atividade da luciferase é medida, conforme descrito no ponto 29.
23. O controlo negativo recomendado é o ácido láctico. A 20 mg deste, preparado num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, acrescenta-se X-VIVO™ 15 até atingir 1 ml (20 mg/ml). Diluem-se 20 mg/ml de solução de ácido láctico por um fator de 5 no X-VIVO™ 15 (4 mg/ml) e transferem-se 500 μ l desta solução de ácido láctico a 4 mg/ml para um poço de um bloco de ensaio de 96 poços. Esta solução é diluída por um fator de 2 em X-VIVO™ 15 e, em seguida, diluída novamente por um fator de 2, de modo a obter soluções a 2 mg/ml e 1 mg/ml. Acrescentam-se 50 μ l destas três soluções e de controlo do veículo (X-VIVO™ 15) a 50 μ l de células THP-G8 em suspensão nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano. Cada concentração do controlo negativo é testada em 4 poços. A placa é agitada num agitador de placas e incubada numa incubadora de CO₂ durante 16 horas (37 °C, 5 % CO₂), após o que a atividade da luciferase é medida, conforme descrito no ponto 29.
24. Podem utilizar-se outros controlos positivos ou negativos adequados, se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução.
25. Deve ter-se o cuidado de evitar a evaporação de produtos químicos em estudo voláteis e a contaminação cruzada entre poços pelos produtos químicos em estudo, por exemplo selando a placa antes da incubação com os produtos químicos em estudo.
26. Os produtos químicos em estudo e o controlo do solvente exigem 2 a 4 execuções para derivar uma previsão positiva ou negativa (ver quadro 2). Cada execução é efetuada num dia diferente, com uma solução-mãe dos produtos químicos em estudo no X-VIVO™ 15 fresca e células colhidas separadamente. As células podem ser provenientes da mesma passagem.

Medições da atividade da luciferase

27. A luminescência é medida utilizando um luminómetro para microplacas de 96 poços equipado com filtros óticos, por exemplo das séries Phelios (ATTO, Tóquio, Japão), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Alemanha) ou ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Para garantir a reprodutibilidade, o luminómetro deve ser calibrado para cada ensaio (19). Estão disponíveis para esta calibração luciferases recombinantes de cor de laranja e vermelha.
28. Transfere-se 100 µl de reagente pré-aquecido Tripluc® Luciferase (Tripluc) para cada poço da placa que contém a suspensão de células tratadas, com ou sem produto químico. A placa é agitada durante 10 minutos a uma temperatura ambiente de cerca de 20 °C antes de ser colocada no luminómetro para medir a atividade da luciferase. A bioluminescência é medida durante três segundos sem filtro ótico (F0) e, em seguida, durante três segundos com filtro ótico (F1). Deve justificar-se o recurso a parâmetros alternativos, por exemplo em função do modelo de luminómetro utilizado.
29. Para cada concentração, os parâmetros são calculados a partir dos valores medidos, por exemplo IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, a média ± desvio padrão (DP) da IL8LA, a média ± DP da GAPLA, a média ± DP da nIL8LA, a média ± DP da Ind-IL8LA, a média ± DP da Inh-GAPLA e o intervalo de confiança de 95 % da Ind-IL8LA. As definições dos parâmetros utilizados no presente ponto são fornecidas nos apêndices 3.1 e 3.4, respetivamente.
30. Antes de proceder à medição num ensaio de repórter multicolor, convém realizar uma discriminação das cores, geralmente com o auxílio de detetores (luminómetro e leitor de placas) equipados com filtros óticos, tais como filtros de rejeição de banda (passa-alta ou passa-baixa) ou filtros passa-banda. Os coeficientes de transmissão dos filtros para cada cor do sinal de bioluminescência devem ser calibrados antes do ensaio, em conformidade com o apêndice 3.2.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

31. Os critérios a respeitar em cada execução para obter uma decisão positiva/negativa são os seguintes:
 - uma previsão com o ensaio IL-8 Luc é considerada positiva se o produto químico em estudo apresentar um valor Ind-IL8LA $\geq 1,4$ e se o limite inferior do intervalo de confiança de 95 % para Ind-IL8LA for $\geq 1,0$;
 - uma previsão com o ensaio IL-8 Luc é considerada negativa se o produto químico em estudo apresentar um valor Ind-IL8LA $< 1,4$ e/ou se o limite inferior do intervalo de confiança de 95 % para Ind-IL8LA for $< 1,0$.

Modelo preditivo

32. Os produtos químicos em estudo que apresentam dois resultados positivos entre a primeira, a segunda, a terceira ou a quarta execuções são considerados positivos, ao passo que os que apresentam três resultados negativos entre a primeira, a segunda, a terceira ou a quarta execuções são considerados potencialmente negativos (quadro 2). Entre os produtos químicos potencialmente negativos, os produtos químicos dissolvidos a 20 mg/ml no X-VIVO™ 15 são considerados negativos, ao passo que os produtos químicos não dissolvidos a 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 não devem ser tidos em conta (figura 1).

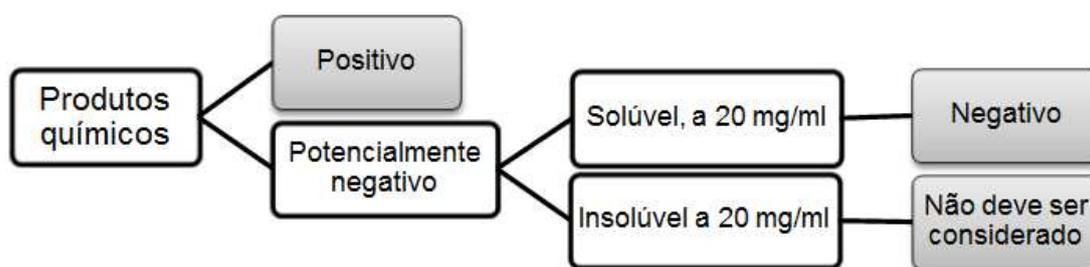
Quadro 2

Critérios de identificação dos produtos positivos e potencialmente negativos

1. ^a execução	2. ^a execução	3. ^a execução	4. ^a execução	Previsão final	
Positivo	Positivo	–	–	Positivo	
	Negativo	Positivo	–	Positivo	
		Negativo	Positivo	Positivo	
			Negativo	Potencialmente negativo	
Negativo	Positivo	Positivo	–	Positivo	
		Negativo	Positivo	Positivo	
			Negativo	Potencialmente negativo	
	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
			Negativo	Potencialmente negativo	
		Negativo	–	Potencialmente negativo	

Figura 1

Modelo preditivo para a decisão final



Critérios de aceitação

33. Ao utilizar o método de ensaio IL-8 Luc, devem respeitar-se os critérios de aceitação a seguir indicados:

- O valor Ind-IL8LA deve ser superior a 5,0, pelo menos, a uma concentração do controlo positivo, 4-NBB, em cada execução.
- O valor Ind-IL8LA deve ser inferior a 1,4 a qualquer concentração do controlo negativo (ácido láctico), em cada execução.

- Os dados resultantes de placas para as quais o valor GAPLA dos poços de controlo com células e Tripluc mas sem produtos químicos seja inferior a 5 vezes o valor dos poços que contêm apenas o meio de ensaio (50 µl/poço de RPMI-1640 contendo 10 % de SBF e 50 µl/poço de X-VIVO™ 15) não devem ser tidos em conta.
- Os dados resultantes de placas para as quais o valor Inh-GAPLA a todas as concentrações dos produtos químicos em estudo ou de controlo seja inferior a 0,05 não devem ser tidos em conta. Neste caso, a primeira execução deve ser repetida, de modo a que a concentração final mais elevada no ensaio replicado seja a concentração final mais baixa da execução anterior.

Relatório de ensaio

34. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo

Substância monocomponente:

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, solubilidade na água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas pertinentes, na medida em que estejam disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Solubilidade em X-VIVO™ 15. No caso de produtos químicos insolúveis em X-VIVO™ 15, se se observa precipitação ou flotação após centrifugação;
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo, se não tiver sido utilizado o X-VIVO™ 15.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

- Aspeto físico, solubilidade na água e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;
- Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Solubilidade em X-VIVO™ 15. No caso de produtos químicos insolúveis em X-VIVO™ 15, se se observa precipitação ou flotação após centrifugação;
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo, se não tiver sido utilizado o X-VIVO™ 15.

Controlos

Controlo positivo:

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, solubilidade na água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas, se conhecidas e se pertinente;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Referência a resultados históricos relativos ao controlo positivo que demonstrem a conformidade com os critérios de aceitação, se pertinente.

Controlo negativo:

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS e/ou outros identificadores;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

- Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se forem utilizados controlos negativos diferentes dos mencionados nas orientações de ensaio e na medida em que se encontrem disponíveis;
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente, para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

- Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;
- Descrição do método de ensaio utilizado;
- Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);
- Número de lote e origem do SBF, nome do fornecedor, número de lote da placa negra de 96 poços de fundo plano e número de lote do reagente Tripluc;
- Número de passagens e densidade celular utilizadas para o ensaio;
- Método de contagem celular utilizado para a inoculação antes do ensaio e medidas tomadas para assegurar a homogeneidade da distribuição do número de células;
- Luminómetro utilizado (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, substrato de luciferase utilizado e demonstração da adequação das medições de luminescência com base no ensaio de controlo descrito no apêndice 3.2;
- Procedimento utilizado para demonstrar a competência do laboratório para a realização do ensaio (por exemplo, através testando as substâncias para a demonstração de competência) ou para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo.

Procedimento de ensaio

- Número de replicados e de execuções efetuadas;
- Concentrações do produto químico em estudo, procedimento de aplicação e tempo de exposição (se forem diferentes dos recomendados);
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;
- Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

- Medições de IL8LA e GAPLA;
- Cálculos para nIL8LA, Ind-IL8LA e Inh-GAPLA;
- O intervalo de confiança de 95 % de Ind-IL8LA;
- Gráfico ilustrativo das curvas dose-resposta para a indução da atividade da luciferase e a viabilidade;
- Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o ensaio IL-8 Luc;
- Exame dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso estejam disponíveis outras informações pertinentes.

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 38:275-84.
- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891-4.
- (15) OECD (2017). A publicar - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, França

- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, França.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol. Disponível em: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, França.
- (21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Apêndice 3.1

DEFINIÇÕES

AOP (Adverse Outcome Pathway – via determinante dos efeitos nocivos): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (20).

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/veículo interage com o sistema de ensaio.

CV05: Viabilidade celular 05, ou seja, a concentração mínima à qual os produtos químicos produzem um valor Inh-GAPLA inferior a 0,05.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (16).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo simultaneamente com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios, utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (16).

FlnSLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a Ind-IL8LA. Ver Ind-IL8LA para a definição.

GAPLA: Atividade da luciferase vermelha Stable Luciferase Red (SLR) ($\lambda_{\text{máx.}} = 630 \text{ nm}$), regulada pelo promotor da GAPDH e que demonstra a viabilidade celular e o número de células viáveis.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment – abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

II-SLR-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a Inh-GAPLA. Ver Inh-GAPLA para a definição.

IL-8 (interleucina-8): Uma citocina derivada de células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e monócitos que provoca a quimiotaxia dos neutrófilos e dos linfócitos T.

IL8LA: Atividade da luciferase laranja Stable Luciferase Orange (SLRO) ($\lambda_{\text{máx.}} = 580 \text{ nm}$), regulada pelo promotor da IL-8.

Ind-IL8LA: Variação de indução da nIL8LA. Obtém-se dividindo o valor nIL8LA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos pelo valor das células THP-G8 não estimuladas; representa a indução da atividade do promotor da IL-8 por produtos químicos.

Inh-GAPLA: Inibição da GAPLA. Obtém-se dividindo o valor GAPLA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos pelo valor GAPLA das células THP-G8 não tratadas; representa a citotoxicidade dos produtos químicos.

Limiar mínimo de indução (LMI): A concentração mais baixa à qual um produto químico satisfaz os critérios de positividade.

Método de ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

nIL8LA: A atividade da SLO que reflete a atividade do promotor da IL-8 (IL8LA) normalizada pela atividade da SLR que reflete a atividade do promotor da GAPDH (GAPLA). Representa a atividade do promotor da IL-8 depois de considerar a viabilidade celular ou o número de células.

nSLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a nIL8LA. Ver nIL8LA para a definição

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (16).

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (16).

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (16).

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS*): Sistema 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 dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (21).

SLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a IL8LA. Ver IL8LA para a definição.

SLR-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a GAPLA. Ver GAPLA para a definição.

Substância: Um elemento químico e seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e quaisquer impurezas resultantes do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem alterar a sua composição.

Substância monocomponente: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais do que um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes é que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Tensioativo: Também designado agente de superfície, é uma substância, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial de um líquido, permitindo-lhe formar espuma ou penetrar em sólidos; é igualmente designado por agente molhante. (TG437)

THP-G8: Uma linha celular repórter da IL-8 utilizada no ensaio IL-8 Luc. A linha celular humana semelhante a macrófagos THP-1 foi transfetada com os genes da luciferase SLO e SLR sob o controlo dos promotores da IL-8 e da GAPDH, respetivamente.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Apêndice 3.2

PRINCÍPIO DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE E DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE TRANSMISSÃO DE FILTRO ÓTICO PARA SLO E SLR

O sistema de ensaio multirrepórter – Tripluc – pode ser utilizado com luminómetro de microplacas equipado com um sistema de deteção multicolor com filtro ótico (por exemplo, Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). O filtro ótico utilizado na medição é um filtro passa-alta ou passa-baixa de 600-620 nm ou um filtro passa-banda de 600-700 nm.

Medição de duas cores de luciferase com um filtro ótico

O exemplo seguinte utiliza o Phelios AB-2350 (ATTO). Este luminómetro está equipado com um filtro passa-alta de 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filtro 1) para separar a luminescência SLO ($\lambda_{\text{máx.}} = 580$ nm) da luminescência SLR ($\lambda_{\text{máx.}} = 630$ nm).

Para determinar os coeficientes de transmissão do filtro passa-alta de 600 nm, convém, em primeiro lugar, utilizando enzimas luciferases SLO e SLR purificadas: i) medir a intensidade da bioluminescência de SLO e SLR na ausência de filtro (F0), ii) medir a intensidade da bioluminescência de SLO e SLR que atravessou o filtro 1 (passa-alta 600 nm) e iii) calcular os coeficientes de transmissão do filtro 1 (600 nm) para SLO e SLR abaixo indicados.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	κO_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Se a intensidade de SLO e SLR na amostra de ensaio for definida como O e R, respetivamente, i) a intensidade da luz sem filtro (todas as óticas) F0 e ii) a intensidade da luz transmitida através do filtro 1 (600 nm) F1 são descritas como se segue.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Estas equações podem ser reformuladas do seguinte modo:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Em seguida, utilizando os fatores de transmissão calculados (κO_{R60} e κR_{R60}) e os valores F0 e F1 medidos, é possível calcular os valores O e R do seguinte modo:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiais e métodos para determinação do fator de transmissão

(1) Reagentes

Enzimas luciferases purificadas:

Enzima SLO purificada liofilizada

Enzima SLR purificada liofilizada

(que, para os trabalhos de validação, foram obtidas junto do GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão com a linha celular THP-G8)

Reagente do ensaio:

Reagente Tripluc® Luciferase (por exemplo, de TOYOBO Cat#MRA-301)

Meio: para o ensaio da luciferase (30 ml, armazenada a 2-8 °C)

Reagente	Conc.	Conc. final no meio	Volume necessário
RPMI-1640	—	—	27 ml
SBF	—	10 %	3 ml

(2) Preparação da solução enzimática

Dissolver a enzima luciferase purificada liofilizada no tubo, adicionando 200 µl de 10 ~ 100 mM Tris/HCl ou Hepes/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) e complementado com 10 % (m/v) de glicerol; dividir a solução enzimática em alíquotas de 10 µl em tubos descartáveis de 1,5 ml e armazená-los num congelador a -80 °C. A solução enzimática congelada pode ser utilizada no prazo de seis meses. Para utilizar as soluções, adicionar 1 ml de meio do ensaio da luciferase (RPMI-1640 com 10 % de SBF) a cada tubo de solução enzimática (solução enzimática diluída) e mantê-los em gelo, a fim de evitar a desativação.

(3) Medição da bioluminescência

Descongelar o reagente do ensaio Tripluc® Luciferase e mantê-lo à temperatura ambiente, quer em banho-maria, quer à temperatura do ar. Ligar o luminómetro 30 minutos antes do início da medição para permitir a estabilização do fotomultiplicador. Transferir 100 µl da solução enzimática diluída para uma placa negra de 96 poços (fundo plano) (amostra de referência SLO para #B1, #B2, #B3 e amostra de referência SLR para #D1, #D2, #D3). Em seguida, transferir 100 µl de Tripluc pré-aquecido para cada poço da placa que contém a solução enzimática diluída, utilizando uma pipeta automática. Agitar a placa durante 10 minutos à temperatura ambiente (cerca de 25 °C) num agitador de placas. Retirar as bolhas que se formarem nas soluções nos poços. Colocar a placa no luminómetro para medir a atividade da luciferase. A bioluminescência é medida durante três segundos sem filtro ótico (F0) e, em seguida, durante três segundos com filtro ótico (F1).

O coeficiente de transmissão do filtro ótico foi calculado do seguinte modo:

Coeficiente de transmissão (SLO (κO_{R60}))= (#B1 de F1+ #B2 de F1+ #B3 de F1) / (#B1 de F0+ #B2 de F0+ #B3 de F0)

Coeficiente de transmissão (SLR (κR_{R60}))= (#D1 de F1+ #D2 de F1+ #D3 de F1) / (#D1 de F0+ #D2 de F0+ #D3 de F0)

Os fatores de transmissão calculados são utilizados para todas as medições executadas utilizando o mesmo luminómetro.

Controlo da qualidade do equipamento

Devem utilizar-se os procedimentos descritos no protocolo IL-8 Luc (18).

Apêndice 3.3

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo a previsão esperada com o ensaio IL-8 Luc para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência (selecionadas para representar o intervalo de respostas possíveis ao perigo de sensibilização cutânea). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o ensaio IL-8 Luc. Além disso, existem dados de referência publicados para o ensaio IL-8 Luc (6) (1).

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o ensaio IL-8 Luc

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado	Solubilidade em X-VIVO15 a 20 mg/ml	Previsão <i>in vivo</i> (1)	Previsão IL-8 Luc (2)	Intervalo de referência (µg/ml) (3)	
						CV ₀₅ (4)	MIT IL-8 Luc (5)
2,4-Dinitroclorobenzeno	97-00-7	Sólido	Insolúvel	Sensibilizante (extremo)	Positivo	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldeído	50-00-0	Líquido	Solúvel	Sensibilizante (forte)	Positivo	9-30	4-9
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sólido	Insolúvel	Sensibilizante (moderado)	Positivo	250-290	60-250
Etilenodiamina	107-15-3	Líquido	Solúvel	Sensibilizante (moderado)	Positivo	500-700	0,1-0,4
Dimetacrilato de etilenglicol	97-90-5	Líquido	Insolúvel	Sensibilizante (fraco)	Positivo	> 2000	0,04-0,1
4-Alilanisol (estragol)	140-67-0	Líquido	Insolúvel	Sensibilizante (fraco)	Positivo	> 2000	0,01-0,07
Sulfato de estreptomicina	3810-74-0	Sólido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000
Glicerol	56-81-5	Líquido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service.

(1) A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (19).

(2) Com base em valores históricos observados (1) (6).

(3) Os valores CV₀₅ e MIT IL-8 Luc foram calculados utilizando a solubilidade na água dada pelo programa EPI Suite™.

(4) CV₀₅: a concentração mínima à qual os produtos químicos apresentam uma Inh-GAPLA inferior a 0,05.

(5) MIT: as concentrações mais baixas às quais um produto químico satisfaz os critérios de positividade.

Apêndice 3.4

ÍNDICES E CRITÉRIOS DE APRECIÇÃO

nIL8LA (nSLO-LA)

A j-ésima repetição ($j = 1$ a 4) da i-ésima concentração ($i = 0$ a 11) é medida para IL8LA (SLO-LA) e GAPLA (SLR-LA), respetivamente. A IL8LA normalizada, designada por nIL8LA (nSLO-LA), é definida como:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Trata-se da unidade de medida de base neste ensaio.

Ind-IL8LA (FlnSLO-LA)

O aumento médio do valor nIL8LA (nSLO-LA) para a repetição à i-ésima concentração em comparação com a mesma à concentração 0, Ind-IL8LA, é a medida principal deste ensaio. Esta relação é escrita através da fórmula seguinte:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}$$

O laboratório principal propôs que um valor de 1,4 corresponda a um resultado positivo para o produto químico em estudo. Este valor baseia-se na investigação dos dados históricos do laboratório principal. A equipa de gestão dos dados utilizou, em seguida, este valor em todas as fases do estudo de validação. O principal resultado, Ind-IL8LA, é o rácio de duas médias aritméticas, tal como demonstrado na equação.

Intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %)

A precisão desta medida do resultado principal é estimada graças ao intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %) baseado no rácio. O limite inferior do IC 95 % ≥ 1 indica que o valor nIL8LA à i-ésima concentração é significativamente superior ao valor obtido com o controlo do solvente. O IC 95 % pode ser calculado de várias formas. No presente estudo, foi utilizado o método conhecido como teorema de Fieller. Segundo este teorema, o intervalo de confiança de 95 % obtém-se por recurso à seguinte fórmula:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

em que

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_i L8LA_{0j}$$

$$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_i L8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$$

$$n_{yi} = 4$$

$$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (n_i L8LA_{ij})$$

$$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (n_i L8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

é o percentil 97,5 da distribuição central t com o v do grau de liberdade, em que

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right)^2 / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

O valor Inh-GAPLA é um rácio do valor GAPLA médio (SLR-LA) para a repetição da i-ésima concentração, comparativamente ao valor obtido com o controlo do solvente, escrito conforme se segue:

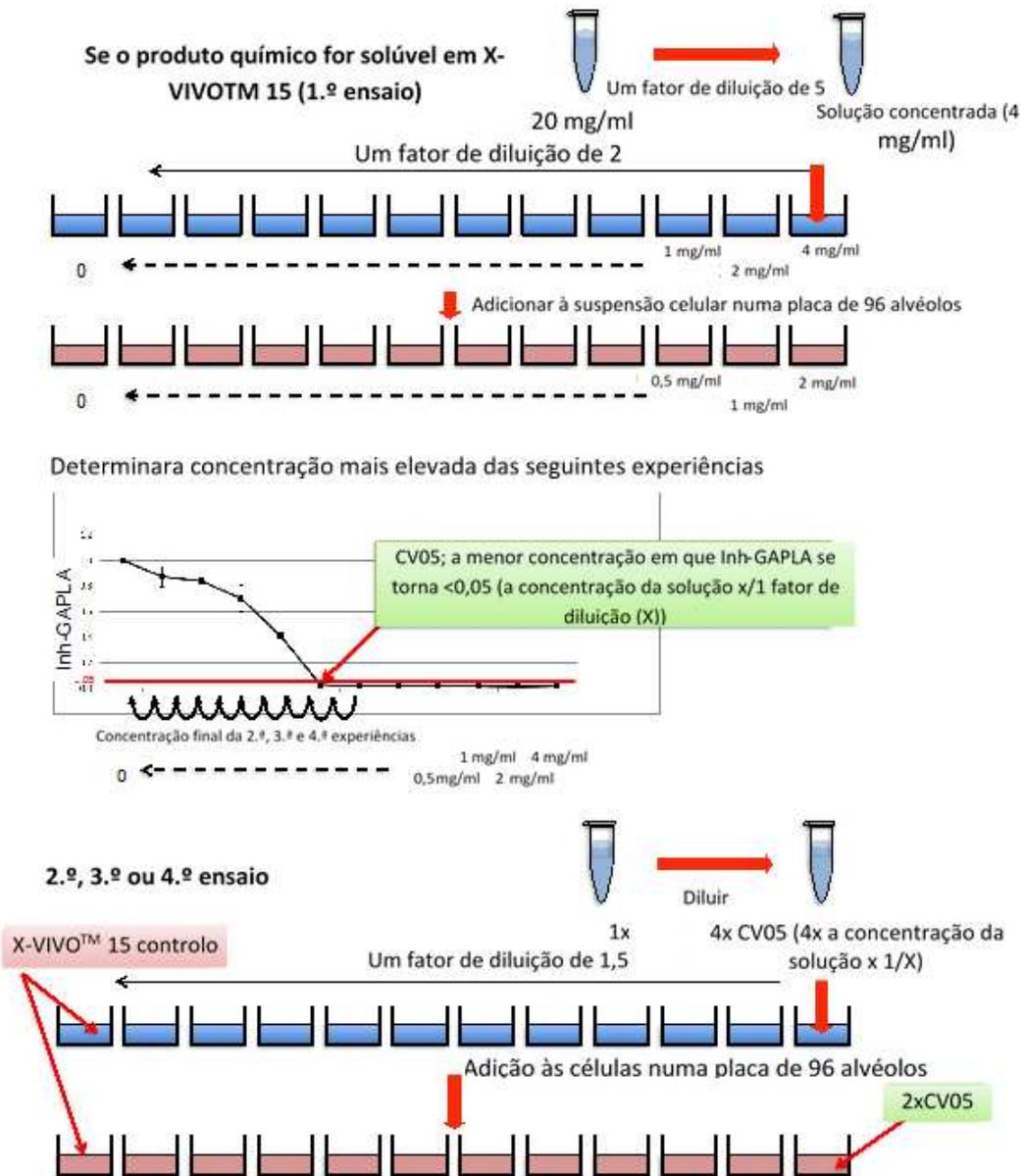
$$\text{Inh-GAPLA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{0j} \right\}.$$

Dado que o valor GAPLA é o denominador da niL8LA, um valor extremamente baixo provoca uma grande variação no valor niL8LA. Por conseguinte, os valores Ind-IL8LA com um valor extremamente baixo para Inh-GAPLA (inferior a 0,05), podem ser considerados pouco precisos.

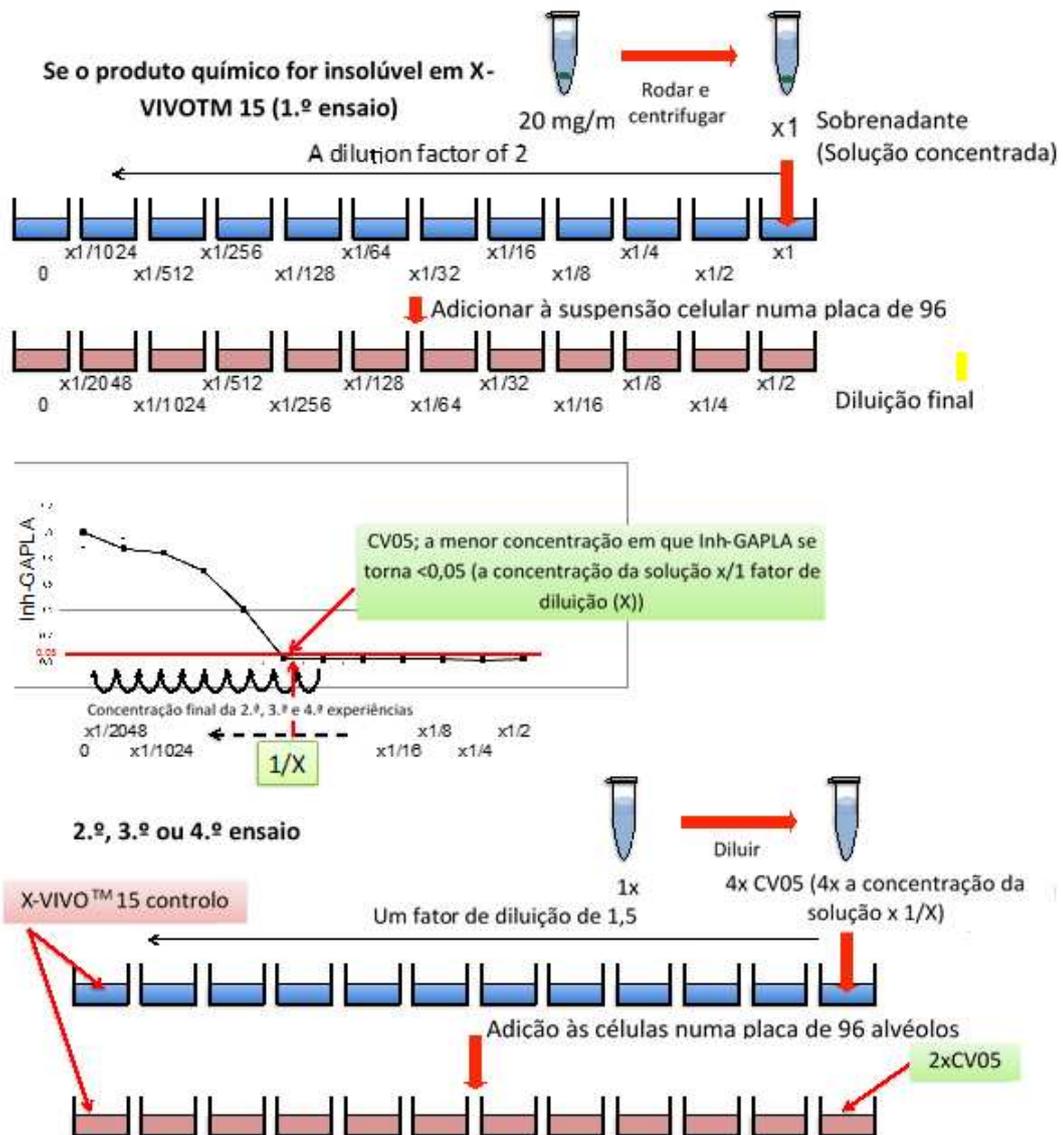
Apêndice 3.5

ESQUEMA DOS MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS PARA O ENSAIO IL-8 LUC.

(a) Para os produtos químicos dissolvidos em X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



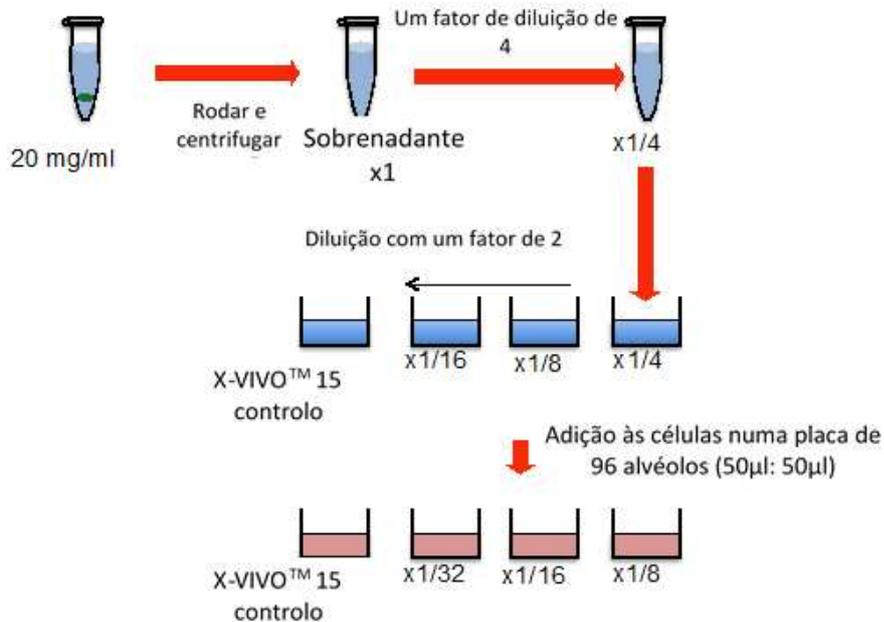
(b) Para produtos químicos insolúveis em X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



Apêndice 3.6

ESQUEMA DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE 4-NBB PARA O CONTROLO POSITIVO DO ENSAIO IL-8 LUC.

O controlo positivo: 4-NBB (insolúvel em X-VIVO™ 15)



»

(9) Na parte C, são aditados os seguintes capítulos:

«C.52 ENSAIO ALARGADO DE REPRODUÇÃO NUMA GERAÇÃO EM PEIXE DO ARROZ-JAPONÊS (MEOGRT)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente às orientações de ensaio 240 da OCDE (2015). Trata-se de um método de ensaio completo baseado na exposição de peixes ao longo de várias gerações, que visa obter dados passíveis de serem utilizados para avaliar os perigos e os riscos para o ambiente associados aos produtos químicos, nomeadamente produtos suspeitos de serem desreguladores endócrinos. A exposição no ensaio MEOGRT prolonga-se até à eclosão (até duas semanas pós-fecundação – «spf») na segunda geração (F2). Seriam necessárias investigações complementares para justificar a utilidade de um eventual prolongamento da geração F2 para além da eclosão; as informações atualmente disponíveis não fornecem condições nem critérios que justifiquem prolongar a geração F2. No entanto, o método pode ser atualizado à medida que forem surgindo novos dados e informações a ter em conta. Por exemplo, podem ser úteis, em determinadas circunstâncias, orientações para a extensão da geração F2 até à reprodução (por exemplo, no caso de produtos químicos com um elevado potencial de bioconcentração ou de indícios de efeitos transgeracionais noutras taxa). O método pode ser utilizado para avaliar potenciais efeitos crónicos dos produtos químicos – incluindo produtos químicos suscetíveis de terem efeitos desreguladores do sistema endócrino –, nos peixes. Enfatiza potenciais efeitos pertinentes ao nível da população (nomeadamente impactos negativos na sobrevivência, no desenvolvimento, no crescimento e na reprodução), a fim de calcular uma concentração sem efeitos observáveis (NOEC) ou uma concentração efetiva a \times % (CE_x), embora se deva notar que as abordagens do tipo CE_x raramente são adequadas para estudos de grande dimensão deste tipo, em que o aumento do número de concentrações de ensaio a fim de determinar a CE_x desejada pode ser inviável e causar problemas significativos em termos de bem-estar animal devido ao elevado número de indivíduos utilizados. Para produtos químicos que não exijam uma avaliação ao longo de várias gerações ou que não sejam potenciais desreguladores endócrinos, pode ser mais adequado recorrer a outros métodos de ensaio (1). O peixe-do-arroz-japonês é a espécie adequada para utilização no presente método de ensaio, dado o seu ciclo de vida curto e a possibilidade de determinar o sexo genético (2), que é considerado um componente crítico do método. Os procedimentos e os parâmetros específicos descritos são aplicáveis apenas ao peixe-do-arroz-japonês. Outras espécies de peixes de pequena dimensão (por exemplo, peixe-zebra) podem ser adaptadas a um protocolo de ensaio semelhante.
2. O presente método de ensaio mede vários parâmetros biológicos. Trata-se, em primeiro lugar, de enfatizar os potenciais efeitos nocivos nos parâmetros pertinentes em termos das populações, incluindo a sobrevivência, o desenvolvimento visível, o crescimento e a reprodução. Em segundo lugar, para fornecer informações mecanísticas e estabelecer ligações entre os resultados de outros tipos de estudos de campo e laboratoriais que proporcionem provas *a posteriori* de uma atividade potencialmente desreguladora do sistema endócrino (por exemplo, atividade androgénica ou estrogénica noutros testes e ensaios), obtêm-se outras informações úteis medindo o ARN mensageiro da *vitelogenina* (ARNm *vtg*) – ou a proteína vitelogenina, VTG –, determinando as características sexuais secundárias (CSS) fenotípicas relacionadas com o sexo genético e procedendo a uma avaliação histopatológica. Note-se que, se um produto químico em estudo ou os seus metabolitos não forem suspeitos de serem perturbadores endócrinos, pode não ser necessário medir estes parâmetros secundários e ser mais adequado realizar estudos que exijam uma quantidade inferior de recursos e de animais (1). As definições utilizadas no presente método de ensaio constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Devido ao número limitado de produtos químicos testados e de laboratórios envolvidos na validação do presente método de ensaio, bastante complexo, prevê-se que, quando estiver disponível um número suficiente de estudos para determinar o impacto desta nova conceção, o método seja reexaminado e, se necessário, atualizado à luz da experiência adquirida. Os dados podem ser utilizados ao nível 5 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos (3). O ensaio inicia-se com a exposição de peixes adultos (geração F0) ao produto químico em estudo durante a fase de reprodução. A exposição prossegue durante as fases de desenvolvimento e de reprodução na geração F1 e durante a fase de eclosão na geração F2; deste modo, o ensaio permite avaliar as vias endócrinas, tanto estruturais como ativacionais. Na interpretação dos parâmetros medidos a nível endócrino, pode aplicar-se uma abordagem baseada na análise do peso da prova.
4. O ensaio deve incluir um número de indivíduos suficiente para a avaliação dos parâmetros relativos à reprodução (ver apêndice 3), assegurando que esse número seja o mínimo necessário, por razões de bem-estar animal. Tendo em conta o elevado número de animais utilizados, é importante ponderar atentamente a necessidade de realizar o ensaio em função dos dados de que se disponha, os quais podem já conter informações pertinentes sobre muitos dos parâmetros medidos no ensaio MEOGRT. O documento da OCDE sobre o quadro de ensaio da toxicidade nos peixes pode auxiliar neste sentido (1).

5. O método de ensaio foi concebido essencialmente para distinguir os efeitos de uma única substância. No entanto, se for necessário realizar o ensaio de uma mistura, convém verificar se os resultados serão aceitáveis para a finalidade regulamentar pretendida.
6. Antes do início do ensaio, é importante dispor de informações sobre as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, nomeadamente para garantir a estabilidade das soluções químicas produzidas. É igualmente necessário dispor de um método analítico suficientemente sensível para verificar as concentrações do produto químico em estudo.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O ensaio começa pela exposição de machos e fêmeas sexualmente maduros (pelo menos 12 spf) em casais reprodutores, durante três semanas, no decurso as quais o produto químico em estudo é distribuído no organismo da geração parental (F0) de acordo com o respetivo comportamento toxicocinético. Os ovos são recolhidos o mais próximo possível do primeiro dia da quarta semana para iniciar a geração F1. Durante a criação da geração F1 (15 semanas no total), são avaliadas a taxa de eclosão e a sobrevivência. Além disso, os peixes são recolhidos às 9-10 spf para a medição dos parâmetros de desenvolvimento e a desova é avaliada durante três semanas, da spf 12 até à 14. A geração F2 é iniciada após a terceira semana de avaliação da reprodução e criada até ao final da eclosão.

CRITÉRIOS DE VALIDADE DO ENSAIO

8. São aplicáveis os seguintes critérios de validade do ensaio:
 - A concentração de oxigénio dissolvido deve ser $\geq 60\%$ do valor da saturação no ar durante todo o ensaio;
 - A temperatura média da água ao longo de todo o estudo deve situar-se entre 24 e 26 °C. Eventuais afastamentos de curta duração relativamente à média em determinados aquários não devem ser superiores a 2 °C;
 - A fecundidade média dos controlos em cada geração (F0 e F1) deve ser superior a 20 ovos por casal e por dia. A fertilidade de todos os ovos produzidos durante a avaliação deve ser superior a 80 %. Além disso, 16 dos 24 casais reprodutores de controlo recomendados ($> 65\%$) devem produzir mais de 20 ovos por casal e por dia;
 - A taxa de eclosão dos ovos deve ser $\geq 80\%$ (em média) nos controlos (em cada uma das gerações F1 e F2);
 - A sobrevivência após a eclosão até 3 spf e a partir de 3 spf até à eutanásia, para a geração F1 (ou seja, 15 spf), deve ser $\geq 80\%$ (em média) e $\geq 90\%$ (em média), respetivamente, nos controlos (F1);
 - Os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo dissolvido foram corretamente mantidas num intervalo de $\pm 20\%$ em relação à média dos valores medidos.

No que diz respeito à temperatura da água, embora não se trate de um critério de validade, os replicados no âmbito de um tratamento, assim como os grupos de tratamento no âmbito do ensaio, não devem diferir estatisticamente uns dos outros (atendendo às temperaturas medidas diariamente e excluindo eventuais afastamentos de curta duração).

9. Embora se possa observar uma diminuição da reprodução nos grupos expostos às concentrações mais elevadas, a reprodução deve ser suficiente, para encher as eclorosas, pelo menos no terceiro grupo mais exposto e em todos os grupos menos expostos da geração F0. Além disso, a sobrevivência embrionária no terceiro grupo mais exposto e nos grupos menos expostos da geração F1 deve permitir avaliar os parâmetros medidos aquando da amostragem subadulta (ver pontos 36 e 38 do apêndice 9). Além disso, deve-se observar pelo menos uma taxa mínima de sobrevivência pós-eclosão ($\sim 20\%$) no segundo grupo de exposição mais exposto de F1. Não se trata de critérios de validade *per se*, mas de recomendações destinadas a permitir o cálculo de NOEC sólidas.

10. Caso se observe um desvio em relação aos critérios de validade, devem analisar-se as consequências em relação à fiabilidade dos resultados do ensaio, devendo os desvios e a sua apreciação ser referidos no relatório de ensaio.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

11. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:
 - a) Medidores de oxigénio e de pH;
 - b) Equipamento para determinação da dureza e da alcalinidade da água;
 - c) Aparelho adequado para o controlo da temperatura e, de preferência, um acompanhamento contínuo;
 - d) Cubas de um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver apêndice 3);
 - e) Balança de precisão apropriada (isto é, com uma precisão de $\pm 0,5$ mg).

Água

12. Pode utilizar-se nos ensaios qualquer água na qual a espécie em estudo apresente taxas adequadas de crescimento e de sobrevivência a longo prazo. A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente o resultado do ensaio (por exemplo, por complexação do produto químico em estudo) nem afeta negativamente o desempenho dos progenitores, devem colher-se regularmente amostras para análise. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , etc.), de pesticidas, de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão, por exemplo, de seis em seis meses, caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém relativamente constante. No apêndice 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a $\pm 0,5$ unidades de pH.

Sistema de exposição

13. Não se especificam a conceção e os materiais utilizados no sistema de exposição. Para a construção desse sistema, devem utilizar-se vidro, aço inoxidável ou outro material quimicamente inerte que não tenha sido contaminado em ensaios anteriores. Para efeitos do presente ensaio, pode ser adequado um sistema de exposição constituído por um sistema de fluxo contínuo (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Soluções de ensaio

14. A solução-mãe do produto químico em estudo deve ser introduzida no sistema de exposição por meio de uma bomba adequada. O débito da solução deve ser calibrado à luz da confirmação analítica das soluções de ensaio antes do início da exposição e deve ser objeto de controlo volumétrico periódico durante o ensaio. Em cada câmara, a solução é renovada em função das necessidades (por exemplo, mínimo de 5 renovações de volume/dia até 16 renovações de volume/dia ou até um débito de 20 ml/min), consoante a estabilidade do produto químico em estudo e a qualidade da água.

15. As soluções de ensaio são ajustadas à concentração pretendida por diluição da solução-mãe. De preferência, esta deve ser preparada por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição por meios mecânicos (agitação e/ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas/sistemas de saturação ou métodos de dosagem passiva (14) para obter uma solução-mãe com a concentração pretendida. Devem realizar-se todos os esforços para evitar a utilização de solventes ou outros veículos, porque: (1) alguns solventes podem, por si só, induzir toxicidade e/ou respostas indesejáveis ou inesperadas; (2) o ensaio de produtos químicos acima da sua solubilidade em água (frequente quando se utilizam solventes) pode resultar em determinações inexatas das concentrações efetivas; (3) a utilização de solventes pode resultar num grau significativo de formação de biofilmes decorrente da atividade microbiana, passível de ter impacto nas condições ambientais, bem como na capacidade de manter concentrações de exposição e (4) na ausência de dados históricos que demonstrem que o solvente não influencia o resultado do estudo, a utilização de solventes exige um tratamento com base no bem-estar animal, na medida em que são necessários mais indivíduos para a realização do ensaio. Para os produtos químicos difíceis de ensaiar, é possível, em último recurso, utilizar um solvente; consultar o documento de orientações n.º 23 da OCDE sobre ensaios de toxicidade aquática de substâncias e misturas difíceis (15), para determinar o melhor método. A escolha do solvente será determinada pelas propriedades químicas do produto químico em estudo e pela existência de dados históricos sobre a utilização do solvente. Se forem utilizados solventes como veículos, devem realizar-se controlos adequados para o solvente para além dos controlos (negativos) sem solvente (apenas água de diluição). Caso seja inevitável a utilização de um solvente e ocorra atividade microbiana (formação de biofilmes), recomenda-se o registo ou a inclusão no relatório da presença de biofilme em cada cuba (pelo menos uma vez por semana) durante todo o ensaio. Idealmente, a concentração de solvente deve ser mantida constante no controlo com solvente e em todos os grupos de tratamento. Se tal não suceder, deve-se utilizar no controlo com solvente a concentração mais elevada utilizada no tratamento de ensaio. Nos casos em que se utiliza um solvente como veículo, as concentrações máximas de solvente não devem exceder 100 µl/l ou 100 mg/l (15), recomendando-se que se mantenha a concentração de solvente mais baixa possível (por exemplo, < 20 µl/l), para evitar os potenciais efeitos do solvente nos parâmetros medidos (16).

Animais de ensaio

Seleção e confinamento dos peixes

16. A espécie utilizada no ensaio é o peixe-do-arroz-japonês, *Oryzias latipes*, devido ao seu curto ciclo de vida e à possibilidade de determinar o sexo genético. Embora outras espécies de pequenos peixes possam ser adaptadas a um protocolo de ensaio semelhante, os métodos e parâmetros de observação específicos descritos no presente método de ensaio são aplicáveis apenas ao peixe-do-arroz-japonês (ver ponto 1). Esta espécie adapta-se bem à reprodução em cativeiro; foram publicados métodos para a sua cultura (17) (18) (19) e estão disponíveis dados relativos à letalidade a curto prazo, às primeiras fases da vida e ao ciclo de vida completo (5) (6) (8) (9) (20). Todos os peixes são submetidos a um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão. Os peixes são alimentados com artémias vivas (*Artemia* spp.), náuplios que podem ser complementados, se necessário, com alimentos floculados disponíveis no mercado. Estes alimentos devem ser analisados regularmente para garantir que não estão contaminados.
17. Desde que sejam seguidas as práticas de criação adequadas, não é necessário aplicar um protocolo de cultura específico. Por exemplo, o peixe-do-arroz-japonês pode ser criado em cubas de 2 litros com 240 larvas por cuba até às 4 spf, depois em cubas de 2 litros com 10 peixes por cuba até às 8 spf, altura em que os casais reprodutores são transferidos para cubas de 2 litros.

Aclimação e seleção dos peixes

18. Os peixes de ensaio devem ser selecionados a partir de uma única unidade populacional de laboratório que tenha sido aclimatada durante, pelo menos, duas semanas antes do ensaio em condições de qualidade da água e de iluminação semelhantes às utilizadas no mesmo (este período de aclimação não é um período de pré-exposição *in situ*). Recomenda-se que os peixes de ensaio sejam obtidos a partir de uma cultura interna, uma vez que o transporte de peixes adultos provoca *stress* e pode interferir com uma reprodução fiável. Os peixes devem ser alimentados duas vezes por dia, durante todo o período de confinamento e durante a fase de exposição, com náuplios de artémia, complementados, se necessário, com um alimento floculado disponível no mercado. Para iniciar o ensaio, considera-se necessário um mínimo de 42 casais reprodutores (54 se for necessário um controlo com solvente, devido, em parte, à falta de dados históricos para justificar o recurso apenas ao controlo sem solvente), de modo a garantir uma replicação adequada. Além disso, há que verificar, para cada casal reprodutor da geração F0, se se trata de um casal XX-XY (apresentando, para cada sexo, a configuração normal de cromossomas sexuais), para evitar a possível inclusão de machos espontâneos XX (ver ponto 39).
19. Durante a fase de aclimação, a mortalidade nos peixes de cultura deve ser registada e devem aplicar-se os critérios seguintes após um período de adaptação de 24 horas:

— Mortalidade superior a 10 % da população na cultura nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: rejeitar o lote completo;

- Mortalidade entre 5 % e 10 % da população nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: aclimação durante um período complementar de sete dias após o período de aclimação de duas semanas; se a mortalidade for superior a 5 % durante o segundo período de sete dias, rejeitar o lote completo;
 - Mortalidade inferior a 5 % da população nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: aceitar o lote.
20. Os peixes não devem receber tratamento em caso de doença durante o período de aclimação de duas semanas que precede o ensaio e durante o período de exposição, devendo evitar-se completamente, se possível, qualquer tratamento. Os peixes com sinais clínicos de doença não devem ser utilizados no estudo. Deve manter-se um registo das observações e de eventuais tratamentos profiláticos e terapêuticos durante o período de cultura anterior ao ensaio.
21. A fase de exposição deve ser iniciada com adultos sexualmente dimórficos, geneticamente sexados, provenientes de uma população laboratorial de animais sexualmente maduros criados a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Os peixes devem ser identificados como reprodutores comprovados (ou seja, que tenha produzido descendência viável) durante a semana que antecede a exposição. Para todo o grupo de peixes utilizados no ensaio, o intervalo de pesos individuais por sexo no início do ensaio deve ser mantido a $\pm 20\%$ da média aritmética do peso dos indivíduos do mesmo sexo. Antes do ensaio, deve proceder-se à pesagem de uma subamostra de peixes para estimar o peso médio. Os peixes selecionados devem ter pelo menos 12 spf e ter um peso $\geq 300\text{ mg}$ para as fêmeas e $\geq 250\text{ mg}$ para os machos.

CONCEÇÃO DO ENSAIO

Concentrações de ensaio

22. Recomenda-se a utilização de cinco concentrações do produto químico em estudo, para além do(s) controlo(s). Todas as fontes de informação devem ser tidas em conta aquando da seleção da gama de concentrações de ensaio: relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR), dados estabelecidos pelo método de referências cruzadas, resultados de ensaios com peixes, nomeadamente de toxicidade aguda (capítulo C.1 do presente anexo), de reprodução a curto prazo (capítulo C.48 do presente anexo) e outros métodos de ensaio – por exemplo, capítulos C.15, C.37, C.41, C.47 ou C.49 do presente anexo (21) (22) (23) (24) (25) (26), se disponíveis, ou, se necessário, os resultados de um ensaio de determinação da gama das concentrações que inclua, se possível, uma fase de reprodução. Se for necessário um ensaio para determinar a gama de concentrações, pode ser efetuado em condições (qualidade da água, sistema de ensaio, carga animal) semelhantes às utilizadas para o ensaio definitivo. Caso seja necessário utilizar um solvente e não existam dados históricos disponíveis, pode utilizar-se o ensaio de determinação da gama de concentrações para identificar a adequação do solvente. A concentração máxima de ensaio não deve exceder a solubilidade em água, 10 mg/l ou 1/10 da CL50-96 horas (27). A concentração mais baixa deve ser 10 a 100 vezes inferior à concentração mais elevada. A utilização de cinco concentrações permite não só medir as relações dose-resposta, como também indica a concentração mínima com efeito observável (LOEC) e a NOEC, necessárias para a avaliação dos riscos em determinados programas regulamentares ou contextos jurídicos. Em geral, o fator de espaçamento entre as concentrações nominais do produto químico em estudo entre níveis de tratamento adjacentes é $\leq 3,2$.

Replicados no âmbito dos grupos de tratamento e dos controlos

23. Devem utilizar-se, no mínimo, seis câmaras de ensaio replicadas por cada concentração de ensaio (ver o apêndice 7). Durante a fase de reprodução (exceto para a geração F0), a estrutura de replicação é duplicada para a avaliação da fecundidade, utilizando-se em cada replicado apenas um casal reprodutor (ver ponto 42).
24. Para além da série de concentrações do produto químico em estudo, deve utilizar-se um controlo com água de diluição e, se necessário, um controlo com solvente. Para assegurar um nível adequado de representatividade estatística, deve duplicar-se o número de câmaras de replicação para os controlos (ou seja, devem utilizar-se pelo menos doze replicados para os controlos). Durante a fase de reprodução, o número de replicados nos controlos é duplicado (ou seja, 24 replicados no mínimo, cada um com apenas um casal reprodutor). Após a reprodução, os replicados dos controlos não devem conter mais de 20 embriões (peixes).

PROCEDIMENTO

Início do ensaio

25. Os peixes sexualmente ativos utilizados para iniciar a geração F0 do ensaio são selecionados com base em dois critérios: a idade (normalmente mais de 12 spf, mas de preferência não mais de 16 spf) e o peso ($\geq 300\text{ mg}$ para as fêmeas e $\geq 250\text{ mg}$ para os machos).

26. Os pares macho-fêmea que satisfazem as especificações acima indicadas são transferidos como casais individualizados para as cubas destinadas a receber os replicados, ou seja, doze replicados nos controlos e seis replicados nos grupos tratados com o produto químico no início do ensaio. As cubas são atribuídas aleatoriamente a um tratamento (por exemplo, T1-T5 e controlo) e a um replicado (por exemplo, A-L nos controlos e A-F em tratamento), sendo depois colocadas no sistema de exposição com o débito adequado para cada cuba.

Condições de exposição

27. O apêndice 3 apresenta um resumo completo dos parâmetros e condições do ensaio. O respeito destas especificações deve traduzir-se nos controlos por valores medidos semelhantes aos enumerados no apêndice 4.
28. Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em, pelo menos, um recipiente de ensaio para cada grupo de tratamento e para o grupo de controlo. Estas medições, com exceção da temperatura, devem ser efetuadas, no mínimo, uma vez por semana durante o período de exposição. A temperatura da água ao longo de todo o estudo deve situar-se, em média, entre 24 °C e 26 °C e deve ser medida todos os dias durante o período de exposição. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a $\pm 0,5$ unidades de pH. Os replicados no âmbito de um tratamento, bem como os grupos de tratamento no âmbito do ensaio, não devem diferir estatisticamente uns dos outros (com base nas temperaturas medidas diariamente e excluindo eventuais afastamentos de curta duração).

Duração da exposição

29. O teste expõe os peixes sexualmente aptos à reprodução a partir da geração F0 durante três semanas. Na semana 4 (aproximadamente no dia 24 do ensaio), é estabelecida a geração F1 e os casais reprodutores F0 são eutanasiados, sendo registado o seu peso e comprimento (ver ponto 34). A geração F1 é depois exposta durante mais de 14 semanas (15 semanas no total para F1) e a geração F2 é exposta durante duas semanas até à eclosão. A duração total do ensaio é, em princípio, de 19 semanas (ou seja, até à eclosão da geração F2). A cronologia das operações é apresentada no quadro 2 e explicada em pormenor no apêndice 9.

Regime alimentar

30. Os peixes podem ser alimentados *ad libitum* com *Artemia* spp. (náuplios com 24 horas de vida), complementadas, se necessário, com alimentos floculados disponíveis no mercado. Estes devem ser regularmente analisados para garantir que não estão contaminados com pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) ou bifenilos policlorados (PCB). Devem evitar-se alimentos com um nível elevado de substâncias ativas no sistema endócrino (como fitoestrogénios), que podem comprometer a resposta ao ensaio. Os alimentos não consumidos e as matérias fecais devem ser removidos dos recipientes de ensaio por recurso a um método adequado, por exemplo limpando cuidadosamente o fundo de cada cuba com um sifão. Os lados e o fundo de cada cuba devem também ser limpos uma ou duas vezes por semana (por exemplo, raspando com uma espátula). O apêndice 5 apresenta um exemplo de um regime alimentar. As doses distribuídas baseiam-se no número de peixes por replicado. Por conseguinte, são reduzidas em caso de mortalidade num replicado.

Determinação analítica e medições

31. Antes do início do período de exposição, é necessário verificar o bom funcionamento do sistema de distribuição do produto químico. Devem definir-se todos os métodos analíticos necessários, incluindo o conhecimento suficiente da estabilidade do produto químico no sistema de ensaio. Durante este último, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos adequados, de preferência pelo menos uma vez por semana num replicado para cada grupo de tratamento, mudando todas as semanas de replicado num mesmo grupo de tratamento.
32. Durante o ensaio, os débitos de diluente e de solução-mãe devem ser verificados a intervalos regulares (no mínimo, três vezes por semana). Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, se a concentração do produto químico em estudo em solução tiver sido mantida satisfatoriamente no intervalo de $\pm 20\%$ em relação aos valores médios medidos ao longo de todo o ensaio, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos. No caso de produtos químicos que apresentem uma acumulação marcada nos peixes, as concentrações de ensaio podem diminuir à medida que os peixes crescem. Nesses casos, recomenda-se que a taxa de renovação da solução de ensaio em cada câmara seja adaptada de modo a manter as concentrações de ensaio tão constantes quanto possível.

Observações e parâmetros medidos

33. Os parâmetros medidos são a fecundidade, a fertilidade, a eclosão, o crescimento e a sobrevivência, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos a nível da população. Também devem ser feitas observações diárias do comportamento, havendo que registar quaisquer comportamentos anómalos. Os níveis hepáticos de ARNm *vtg* ou de proteína VTG medidos por imunoensaio (28), os marcadores sexuais fenotípicos – como as papilas da barbatana anal características do macho –, a avaliação histológica do sexo gonadal e a avaliação histopatológica dos rins, do fígado e das gónadas (ver lista de parâmetros no quadro 1) constituem outros parâmetros mecanísticos. Todos estes parâmetros específicos são avaliados no contexto da determinação do sexo genético do indivíduo baseada na presença ou na ausência do gene *dmy*, que determina o sexo masculino no peixe-do-arroz-japonês (ver ponto 41). Além disso, é também avaliado o tempo necessário para a desova. Podem igualmente obter-se rácios sexuais fenotípicos simples utilizando as informações provenientes das contagens de papilas da barbatana anal para definir os indivíduos como macho ou fêmea do ponto de vista fenotípico. Não se espera que o método de ensaio detete desvios ligeiros em relação ao rácio sexual previsto, uma vez que o número relativamente reduzido de peixes por replicado não proporciona uma representatividade estatística suficiente. Além disso, durante a avaliação histopatológica, as gónadas são avaliadas e são realizadas análises muito mais potentes para determinar o fenótipo gonadal no contexto do sexo genético.
34. O principal objetivo do presente método de ensaio consiste em avaliar os potenciais efeitos de um produto químico em estudo numa determinada população. Os parâmetros mecanísticos (VTG, CSS e determinados efeitos histopatológicos nas gónadas) podem também ajudar a determinar se existe um efeito mediado pela atividade endócrina. No entanto, estes parâmetros de ordem mecanística também podem ser influenciados pela toxicidade sistémica ou outras toxicidades. Deste modo, é possível avaliar em pormenor a histopatologia hepática e renal, a fim de melhor compreender as eventuais respostas a nível dos parâmetros mecanísticos. No entanto, mesmo que não se proceda a estas avaliações pormenorizadas, as anomalias visíveis observadas acidentalmente durante a avaliação histopatológica têm, na mesma, de ser registadas e notificadas.

Eutanásia dos peixes

35. No final da exposição das gerações F0 e F1 e aquando da recolha de uma subamostra de peixes subadultos, os peixes devem ser eutanasiados com quantidades adequadas de uma solução anestésica (por exemplo, metanossulfonato de triclaína, MS-222 (n.º CAS 886-86-2), 100-500 mg/l) tamponada com 300 mg/l de NaHCO₃ (bicarbonato de sódio, n.º CAS 144-55-8), para reduzir a irritação da membrana mucosa. Se os peixes apresentarem sinais de sofrimento considerável (muito graves, com morte previsível) e se considerar estarem moribundos, devem ser anestesiados e eutanasiados e tratados como mortalidade para efeitos de análise de dados. Quando um peixe for eutanasiado devido a morbilidade, o facto deve ser registado e notificado. Consoante o momento do estudo em que o peixe é eutanasiado, pode ser removido para uma análise histopatológica (fixando o peixe para possível histopatologia).

Manuseamento dos ovos e das larvas

Colheita de ovos dos casais reprodutores para a reprodução da geração seguinte

36. A colheita dos ovos é efetuada no primeiro dia (ou nos primeiros dois dias, se necessário) da semana de ensaio 4, entre a F0 e a F1, e da semana de ensaio 18, entre a F1 e a F2. A semana de ensaio 18 corresponde a peixes adultos da geração F1, de 15 spf. É importante que todos os ovos sejam retirados de cada cuba no dia anterior ao início da colheita dos ovos, para garantir que todos os ovos recolhidos de um casal reprodutor são provenientes de uma única desova. Após a desova, o peixe-do-arroz-japonês fêmea transporta, por vezes, os seus ovos junto da cloaca até que os possa depositar num substrato. Na ausência de um substrato na cuba, os ovos podem ser encontrados junto à fêmea ou no fundo da cuba. Consoante a sua localização, os ovos são retirados cuidadosamente da fêmea ou sifonados do fundo da cuba na semana de ensaio 4 de F0 e na semana de ensaio 18 da F1. Todos os ovos recolhidos no âmbito de um tratamento são reunidos antes de serem distribuídos pelas câmaras de incubação.
37. Os filamentos que mantêm os ovos postos juntos devem ser removidos. Os ovos fecundados (até 20) são recolhidos de cada casal reprodutor (um casal por replicado), agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática por câmaras de incubação adequadas (apêndices 6 e 7). Utilizando um bom microscópio de dissecação, é possível observar as marcas do início da fecundação/desenvolvimento, tais como a elevação da membrana de fertilização (cório), a divisão celular em curso ou a formação da blástula. As câmaras de incubação podem ser colocadas em «aquários de incubação» separados para cada tratamento (nos quais, neste caso, devem ser medidos os parâmetros de qualidade da água e as concentrações do produto químico em estudo) ou no aquário de replicados que conterà as larvas eclodidas (por exemplo, eleuteroembriões). Se for necessário um segundo dia de colheita (23.º dia de ensaio), todos os ovos de ambos os dias devem ser reunidos e redistribuídos de forma sistemática por cada um dos replicados de tratamento.

Criação de ovos até à eclosão

38. Os ovos fecundados são continuamente agitados, por exemplo, por bolhas de ar dentro da incubadora ou por oscilação vertical da mesma. A mortalidade dos ovos fecundados (embriões) é verificada e registada diariamente. Os ovos mortos são retirados das incubadoras (apêndice 9). No 7.º dia pós-fecundação (dpf), a agitação é interrompida ou reduzida de tal modo que os ovos fecundados se depositem na base da incubadora. Promove-se assim a eclosão, normalmente no dia seguinte ou no segundo dia. Para cada tratamento e controlo, contam-se os alevins (larvas juvenis; eleuterioembriões), agrupando os replicados. Os ovos fecundados que não tenham eclodido ao fim de duas vezes o período médio de eclosão no controlo (normalmente 16 ou 18 dpf) são considerados não viáveis e rejeitados.
39. Transferem-se doze alevins para cada cuba replicada. Os alevins provenientes das câmaras de incubação são reunidos e distribuídos sistematicamente pelas cubas replicadas (apêndice 7). Para tal, pode selecionar-se de forma aleatória um alevim do lote de tratamento e acrescentar sequencialmente um alevim retirado aleatoriamente para um aquário de replicação. Cada cuba deve conter um número igual ($n=12$) das larvas eclodidas (no máximo 20 larvas cada). Se não houver um número suficiente de alevins para preencher todos os replicados expostos ao tratamento, recomenda-se assegurar que o maior número possível de replicados contém 12 alevins. Estes podem ser manipulados com segurança utilizando pipetas de vidro de grande diâmetro. Os alevins suplementares são eutanasiados com um anestésico. Nas semanas anteriores à constituição dos casais reprodutores, é necessário registar o dia em que se observa o primeiro evento de desova em cada replicado.

Constituição dos casais reprodutores

Corte das barbatanas e determinação do sexo genotípico

40. A determinação do sexo genotípico através do corte das barbatanas é efetuada às 9-10 spf (ou seja, semanas de ensaio 12-13 para a geração F1). Todos os peixes de uma cuba são anestesiados por recurso a métodos aprovados – por exemplo, IACUC – e é retirada uma pequena amostra de tecido da extremidade dorsal ou ventral da barbatana caudal de cada peixe, para determinar o sexo genotípico do indivíduo (29). Os peixes de um replicado podem ser alojados em pequenas gaiolas, se possível um por gaiola, na cuba replicada. Em alternativa, podem ser mantidos dois peixes em cada gaiola, se forem distinguíveis uns dos outros. Um método consiste em efetuar cortes diferenciais na barbatana caudal (por exemplo, um na extremidade dorsal e outro na ventral) aquando da recolha da amostra de tecido.
41. O sexo genotípico do peixe-do-arroz-japonês é determinado por um gene identificado e sequenciado (*dmy*), situado no cromossoma Y. A presença do *dmy* indica um indivíduo XY, seja qual for o fenótipo, enquanto a ausência de *dmy* indica um indivíduo XX, independentemente do fenótipo (30); (31). Extrai-se ácido desoxirribonucleico (ADN) de cada corte de barbatana; a presença ou ausência de *dmy* pode ser determinada por métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) [ver apêndice 9 no capítulo C.41 do presente anexo ou os apêndices 3 e 4 em (29)].

Definição de casais reprodutores

42. Para definir casais reprodutores XX-XY, utiliza-se a informação sobre o sexo genotípico, independentemente do fenótipo externo, que pode ser alterado por exposição a um produto químico em estudo. No dia seguinte à determinação do sexo genotípico de cada peixe, são selecionados aleatoriamente dois peixes XX e dois peixes XY de cada replicado e definidos dois casais reprodutores XX-XY. Se um replicado não contiver dois peixes XX ou dois XY, convém encontrar peixes adequados noutros replicados no âmbito do tratamento. A prioridade consiste em obter o número recomendado de replicados de casais reprodutores (12) para cada tratamento e nos controlos (24). Os peixes com anomalias evidentes (problemas de bexiga natatória, malformações espinais, variações de tamanho extremas, etc.) devem ser excluídos aquando da constituição de casais reprodutores. Durante a fase de reprodução para a geração F1, cada cuba replicada deve conter apenas um casal reprodutor.

Amostragem de subadultos e avaliação dos parâmetros

Amostragem de casais não reprodutores

43. Após a constituição dos casais reprodutores, os peixes não selecionados para reprodução são eutanasiados para a medição dos parâmetros de subadultos na semana de ensaio 12-13 (F1). É extremamente importante que os peixes sejam manuseados de forma a que o sexo genotípico determinado para a seleção dos casais reprodutores continue a poder ser associado a um determinado indivíduo. Todos os dados recolhidos são analisados em função do sexo genotípico do peixe específico. Cada peixe é utilizado para determinar diversos parâmetros, nomeadamente as taxas

de sobrevivência dos peixes juvenis/subadultos [semanas de ensaio 7-12/13 (F1)], o aumento do comprimento (pode ser medido o comprimento padrão se a barbatana caudal tiver sido reduzida devido à amostragem para análise do sexo genético; mede-se o comprimento total se apenas tiver sido recortada uma parte da barbatana caudal, dorsal ou ventral, para *dmy*) e a massa corporal (ou seja, peso húmido, peso enxuto), o ARNm *vtg* (ou VTG) hepático e as papilas da barbatana anal (ver quadros 1 e 2). Note-se que, para calcular o crescimento médio num grupo de tratamento, são também necessários o peso e o comprimento dos casais reprodutores.

Recolha de amostras de tecido e medição da vitelogenina

44. O fígado é dissecado e deve ser armazenado a $\leq -70^\circ\text{C}$ até à medição do ARNm *vtg* (ou da VTG). A cauda do peixe, incluindo a barbatana anal, é conservada num fixador adequado (por exemplo, de Davidson) ou fotografada de modo a que seja possível contar, posteriormente, as papilas da barbatana anal. É também possível recolher amostras de outros tecidos (por exemplo, gónadas), se assim se pretender, e conservá-los. A concentração de VTG hepática deve ser quantificada por uma técnica ELISA homóloga (ver os procedimentos recomendados para o peixe-do-arroz-japonês no apêndice 6, capítulo C.48, do presente anexo). Como alternativa, a Agência de Proteção do Ambiente dos EUA estabeleceu os métodos para a quantificação do ARNm *vtg*, ou seja, a extração do ARNm do gene *vtg I* de uma amostra hepática e a quantificação do número de cópias do gene *vtg I* (por ng do ARNm total) por PCR quantitativa (29). Para determinar o número de cópias do gene *vtg* nos grupos de controlo e de tratamento, um método mais económico em termos de recursos e menos difícil do ponto de vista técnico consiste em determinar a variação relativa (fator multiplicativo) na expressão do gene *vtg I* entre os grupos de controlo e de tratamento.

Características sexuais secundárias

45. Em circunstâncias normais, só os peixes-do-arroz-japoneses machos sexualmente maduros têm papilas, que se desenvolvem nas placas de junção de determinados raios da barbatana anal e constituem uma característica sexual secundária, podendo servir de biomarcador para efeitos desreguladores do sistema endócrino. O apêndice 8 apresenta o método de contagem das papilas da barbatana anal (número de placas de junção com papilas). O número de papilas da barbatana anal por indivíduo também é utilizado para classificar os indivíduos como fenótipo externo macho ou fêmea e para estabelecer, assim, um rácio sexual simples para cada replicado. Um peixe-do-arroz-japonês com um número superior a zero é definido como macho; um peixe-do-arroz-japonês com zero papilas da barbatana anal é definido como fêmea.

Avaliação da fecundidade e da fertilidade

46. A fecundidade e a fertilidade são avaliadas nas semanas de ensaio 1 a 3 na geração F0 e nas semanas de ensaio 15 a 17 na geração F1. Os ovos são recolhidos diariamente de cada casal reprodutor durante 21 dias consecutivos, sendo retirados com cuidado de sob o ventre das fêmeas (colocadas numa rede) e/ou sifonados do fundo do aquário todas as manhãs. Tanto a fecundidade como a fertilidade são registadas diariamente para cada casal reprodutor de replicação. A fecundidade é definida como o número de ovos postos e a fertilidade é definida funcionalmente como o número de ovos fecundados e viáveis no momento da contagem. Esta deve ser efetuada o mais rapidamente possível após a colheita dos ovos.
47. A fecundidade dos replicados é registada diariamente como o número de ovos por casal reprodutor, que é analisado pelos procedimentos estatísticos recomendados utilizando os meios de replicação. A fertilidade dos replicados é a soma do número de ovos férteis produzidos por um casal reprodutor dividido pela soma do número de ovos produzidos por esse casal. Estatisticamente, a fertilidade é analisada como um rácio por replicado. A taxa de eclosão dos replicados corresponde ao número de alevins dividido pelo número de embriões carregados (normalmente 20). Estatisticamente, a taxa de eclosão é analisada como rácio por replicado.

Amostragem de adultos e avaliação dos parâmetros

Amostragem de casais reprodutores

48. Após a semana de ensaio 17 (ou seja, após se iniciar com êxito da geração F2), os adultos F1 são eutanasiados e são avaliados vários parâmetros (ver quadros 1 e 2). A barbatana anal é examinada para avaliar as papilas (ver apêndice 8) e/ou a cauda é retirada ao nível imediatamente posterior à cloaca e fixada para contagem posterior das papilas. Uma parte da barbatana caudal pode ser recolhida e neste momento e conservada para efeitos de verificação do sexo genético (*dmy*), se desejado. Se necessário, pode ser colhida uma amostra de tecido para repetir a análise *dmy*, a fim de verificar o sexo genético de um peixe específico. A cavidade corporal é aberta para permitir uma perfusão com um fixador adequado (por exemplo, de Davidson), antes da imersão do corpo inteiro no fixador. No entanto, se for efetuada uma etapa de permeabilização adequada antes da fixação, não é necessário abrir a cavidade corporal.

Histopatologia

49. Cada peixe é objeto de uma avaliação histológica que visa detetar patologias no tecido gonadal (30) (29). Como se indica no ponto 33, outros parâmetros mecanísticos avaliados neste ensaio (por exemplo, VTG, CSS e determinados efeitos histopatológicos gonadais) podem ser influenciados por toxicidade sistémica ou outros tipos de toxicidade. Deste modo, é possível avaliar em pormenor a histopatologia hepática e renal, a fim de melhor compreender as eventuais respostas a nível dos parâmetros mecanísticos. No entanto, mesmo que não se efetuem estas avaliações pormenorizadas, as anomalias visíveis observadas acidentalmente durante a avaliação histopatológica têm, na mesma, de ser registadas e notificadas. Pode ponderar-se uma «leitura descendente», começando pelo grupo de tratamento mais elevado (em comparação com o controlo) e terminando num tratamento sem efeito; contudo, recomenda-se a consulta das orientações relativas à histopatologia (29). Regra geral, todas as amostras são processadas/preparadas antes de serem examinadas pelo patologista. Caso se opte por uma «leitura descendente», importa salientar que o procedimento de Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) se baseia na expectativa de um aumento do impacto biológico (da patologia) à medida que as doses aumentam. Por conseguinte, deixa de se poder considerar apenas uma dose única elevada sem quaisquer doses intermédias. Esta abordagem é aceitável se não for necessário proceder a uma análise estatística para determinar que a dose elevada não tem qualquer efeito. O fenótipo gonadal decorre também desta avaliação.

Outras observações

50. O ensaio MEOGRT fornece dados que podem ser utilizados (por exemplo, numa abordagem baseada na análise do ónus da prova) para avaliar simultaneamente pelo menos dois tipos gerais de vias determinantes dos efeitos nocivos (AOP) que resultam numa perturbação da função reprodutora: a) vias de mediação endócrina com perturbação do eixo endócrino hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG); e b) vias que provocam reduções da sobrevivência, do crescimento (comprimento e peso) e da reprodução através de toxicidade de mediação não endócrina. Os parâmetros geralmente medidos em ensaios de toxicidade crónica, como o ensaio ao longo do ciclo de vida completo e o ensaio nas primeiras fases da vida, são também determinados no presente ensaio e podem ser utilizados para avaliar os perigos inerentes aos modos de ação tóxica de mediação não endócrina e às vias de toxicidade de mediação endócrina. Durante o ensaio, devem fazer-se observações diárias do comportamento, havendo que registar quaisquer comportamentos anómalos. Além disso, deve registar-se a mortalidade e calcular-se a sobrevivência até à seleção dos peixes (semana de ensaio 6/7), a sobrevivência desde a seleção até à amostragem de subadultos (9-10 spf) e a sobrevivência desde a constituição dos casais até à amostragem de peixes adultos.

*Quadro 1***Síntese dos parâmetros do ensaio MEOGRT (*)**

Fase da vida	Parâmetro	Geração
Embrião (2 spf)	Eclosão (% e tempo até à eclosão)	F1, F2
Juvenil (4 spf)	Sobrevivência	F1
Subadulto (9 ou 10 spf)	Sobrevivência	F1
	Crescimento (comprimento e peso)	
	Vitelogenina (ARNm ou proteína)	
	Características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal)	
	Rácio sexual externo	
	Tempo até à 1. ^a desova	
Adulto (12-14 spf)	Reprodução (fecundidade e fertilidade)	F0, F1
Adulto (15 spf)	Sobrevivência	F1
	Crescimento (comprimento e peso)	
	Características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal)	
	Histopatologia (gónadas, fígado, rins)	

(*) Estes parâmetros devem ser objeto de análise estatística

CRONOLOGIA

51. O quadro 2 ilustra a cronologia do ensaio MEOGRT, o qual MEOGRT inclui 4 semanas de exposição de adultos F0 e 15 semanas de exposição da geração F1, assim como um período de exposição da segunda geração (F2), até à eclosão (2 spf). O apêndice 9 recapitula as diferentes etapas do ensaio, do início ao fim do ensaio MEOGRT.

Quadro 2

Cronologia da exposição e dos parâmetros avaliados durante o ensaio MEOGRT

MEOGRT: cronologia da exposição e dos parâmetros																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Semana de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Fase de vida					Embrião				Larva				Juvenil			Subadulto		Adulto	
Parâmetros																			
Fecundidade	F ₀														F ₁				
Fertilidade	F ₀														F ₁				
Eclosão					F ₁												F ₂		
Sobrevivência					F ₁				F ₁								F ₁		
Crescimento					F ₀								F ₁				F ₁		
Vitelogenina									F ₁										
Car. sex. secundárias									F ₁								F ₁		
Histopatologia																	F ₁		
Semana de ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<ul style="list-style-type: none"> • A conceção experimental tem 7 grupos de replicados <ul style="list-style-type: none"> ○ 5 para tratamentos com o produto químico em estudo ○ 2 para os tratamentos de controlo (4 se se utilizar solvente) • Conceção intragrupo <ul style="list-style-type: none"> ○ 12 replicados para reprodução, patologia adulta e CSS (sem. 10 a 18) ○ 6 replicados para eclosão, sobrevivência e vtg; e CSS e crescimento de subadultos (sem. 1 a 9) CSS: caracteres sexuais secundários; sem: semanas; vtg: vitelogenina																			

DADOS E RELATÓRIO

Análise estatística

52. Uma vez que o sexo genotípico é determinado para todos os peixes do ensaio, importa analisar os dados separadamente para cada sexo genotípico (por exemplo, machos XY e fêmeas XX). O incumprimento desta exigência reduzirá, em grande medida, a representatividade estatística de qualquer análise. É preferível efetuar as análises estatísticas seguindo os procedimentos descritos no documento da OCDE sobre os métodos atuais de análise estatística dos dados de ecotoxicidade (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (32). O apêndice 10 fornece mais orientações nesta matéria.
53. A conceção do ensaio e a seleção dos testes estatísticos devem assegurar a possibilidade de para detetar alterações de importância biológica nos parâmetros, sempre que seja necessário comunicar uma NOEC (32). O registo das concentrações efetivas e dos parâmetros pertinentes pode ser condicionado pelo quadro regulamentar aplicável. Convém identificar, para cada parâmetro, a percentagem de variação que importa detetar ou estimar. A conceção experimental deve ser adaptada tendo isso em conta. É improvável que ocorra a mesma variação percentual em todos os parâmetros e que seja possível conceber uma experiência realizável passível de satisfazer os referidos critérios para todos os parâmetros. Por conseguinte, a experiência deve ser concebida de modo a concentrar-se adequadamente nos parâmetros que sejam importantes no seu contexto. O apêndice 10 contém um fluxograma estatístico e orientações para facilitar o tratamento dos dados e a escolha do teste estatístico ou do modelo mais adequado a utilizar. Podem utilizar-se outras abordagens estatísticas, desde que sejam cientificamente justificadas.

54. É necessário analisar as variações em cada série de replicados, efetuando uma análise de variância ou recorrendo a tabelas de contingência, e utilizar métodos de análise estatística suficientes com base nessa análise. A fim de efetuar uma comparação múltipla entre os resultados obtidos para cada concentração e os resultados obtidos com os controlos, recomenda-se um procedimento descendente (por exemplo, o teste de Jonckheere-Terpstra) para respostas contínuas. Se os dados não forem compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona, utiliza-se o teste de Dunnett ou o teste de Dunn (após uma adequada transformação dos dados, se necessário).
55. No que respeita à fecundidade, as contagens de ovos são diárias, mas podem ser analisadas na sua globalidade ou como uma medida repetida. O apêndice 10 descreve pormenorizadamente como analisar este parâmetro. No caso dos dados histopatológicos expressos na forma de índices de gravidade, foi desenvolvido um novo teste estatístico, o Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Devem comunicar-se todos os parâmetros observados nos tratamentos químicos que difiram significativamente dos controlos adequados.

Considerações relativas à análise dos dados

Utilização de níveis de tratamento comprometidos

57. Há que ter em conta vários fatores para determinar se um replicado ou um tratamento completo apresenta sinais de toxicidade manifesta e deve ser excluído da análise. A toxicidade manifesta caracteriza-se por uma mortalidade > 4 indivíduos num replicado entre 3 spf e 9 spf que não possa ser explicada por um erro técnico. As hemorragias, os comportamentos anormais, a natação anormal, a anorexia e quaisquer outros sinais clínicos de doença constituem outros sinais de toxicidade manifesta. No caso de sinais subletais de toxicidade, pode ser necessário proceder a avaliações qualitativas, que devem ser sempre efetuadas tendo por referência o grupo de controlo para a água de diluição (apenas água limpa). Caso surja uma toxicidade manifesta no(s) grupo(s) de tratamento mais exposto(s), recomenda-se que esses tratamentos sejam excluídos da análise.

Controlos com solvente

58. A utilização de um solvente só se deve ponderar em último recurso, após terem sido analisadas todas as outras opções de administração do produto químico. Caso se utilize um solvente, é necessário incluir no ensaio um controlo para a água de diluição. No final do ensaio, deve efetuar-se uma avaliação dos efeitos potenciais do solvente. Para tal, efetua-se uma comparação estatística dos resultados do grupo de controlo com solvente com os do grupo de controlo com água de diluição. Os parâmetros mais importantes a ter em conta nesta análise são os fatores determinantes do crescimento (peso), já que podem ser afetados em caso de toxicidade generalizada. Se se detetarem diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros entre o grupo de controlo com água de diluição e o grupo de controlo com solvente, deve recorrer-se ao parecer de um perito para determinar se a validade do ensaio está comprometida. Se os dois controlos diferirem, os grupos expostos ao produto químico devem ser comparados com o controlo com solvente, a menos que se saiba que é preferível compará-los com o controlo com água de diluição. Caso não haja diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de controlo, recomenda-se que os grupos expostos ao produto químico em estudo sejam comparados com os dois grupos de controlo em conjunto (controlo com solvente e controlo com água de diluição), exceto se se souber que é preferível compará-los, quer com o grupo de controlo com água de diluição, quer com o grupo de controlo com solvente.

Relatório de ensaio

59. O relatório de ensaio deve incluir os seguintes elementos:

Produto químico em estudo: natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes

— Dados de identificação química.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, solubilidade na água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— identificação química, como o nome IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, a pureza, a identidade química das impurezas, se necessário e exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for caso disso).

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Espécie utilizada no ensaio

- Nome científico, estirpe (se conhecida), origem e método de recolha dos ovos fecundados e posterior manuseamento.

Condições de ensaio

- Fotoperíodo(s);
- Conceção do ensaio (por exemplo, tamanho da cuba, volume de água e material, número de câmaras de ensaio e replicados, número de alevins por replicado);
- Método de preparação das soluções-mãe e frequência da renovação (sempre que se utilizem agentes solubilizantes, a sua concentração deve ser indicada);
- Método de dosagem do produto químico em estudo (por exemplo, bombas, sistemas de diluição);
- Eficiência de recuperação do método e valores nominais das concentrações de ensaio, limite de quantificação, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e respetivos desvios-padrão; método de obtenção desses desvios e médias, bem como elementos comprovativos de que as medições correspondem às concentrações do produto químico em estudo perfeitamente dissolvido;
- Características da água de diluição: pH, dureza, temperatura, concentração do oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), carbono orgânico total (idem), sólidos em suspensão (idem), salinidade do meio de ensaio (idem) e quaisquer outras medições efetuadas;
- Os valores nominais das concentrações de ensaio, as médias dos valores medidos e os respetivos desvios-padrão;
- Qualidade da água nos recipientes de ensaio, pH, temperatura (diariamente) e concentração de oxigénio dissolvido;
- Informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo, tipo de alimentos, origem, quantidade distribuída e frequência).

Resultados:

- Provas de que os controlos cumpriram os critérios de validação globais;
- Dados relativos ao grupo de controlo (mais o controlo com o solvente, se utilizado) e aos grupos de tratamento: eclosão (taxa de eclosão e tempo até à eclosão) para F1 e F2, sobrevivência após a eclosão para F1, crescimento (comprimento e peso corporal) para F1, sexo genotípico e diferenciação sexual (por exemplo, características sexuais secundárias baseadas nas papilas da barbatana anal e na histologia gonadal) para F1, sexo fenotípico para F1, características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal) para F1, ARNm vtg (ou proteína VTG) para F1, avaliação histopatológica (gónadas, fígado e rins) para F1 e reprodução (fecundidade e fertilidade) para F0, F1 (ver quadros 1 e 2);
- Abordagem de análise estatística (análise de regressão ou da variância) e tratamento dos dados (testes e modelos estatísticos utilizados);
- Concentração sem efeitos observáveis (NOEC) para cada resposta avaliada;

- Concentração mínima com efeito observável (LOEC) para cada resposta avaliada (a $p=0,05$); CE_x para cada resposta avaliada, se aplicável, e intervalos de confiança (90 % ou 95 %, por exemplo), gráfico do modelo ajustado utilizado para a calcular a CE_x , declive da curva concentração-resposta, fórmula do modelo de regressão e estimativa dos parâmetros do modelo e dos respetivos erros-padrão.
 - Qualquer desvio em relação ao presente método de ensaio e aos critérios de aceitação, bem como considerações relativas às eventuais consequências do resultado do ensaio.
60. No que diz respeito aos resultados das medições dos parâmetros, devem apresentar-se os valores médios e os respetivos desvios-padrão (por replicado e por concentração, se possível).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457-464.
- (5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (7) Kang JJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.
- (11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.

- (12) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Disponível em: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley- Blackwell.
- (20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- (21) Capítulo C.15 do presente anexo: Ensaio de toxicidade de curto prazo nos peixes em estado embrionário e recém-nascidos.
- (22) Capítulo C.37 do presente anexo: Ensaio a 21 dias em peixes: Despistagem a curto prazo de atividade estrogénica e androgénica e de inibição da aromatase.
- (23) Capítulo C.41 do presente anexo, Ensaio de desenvolvimento sexual em peixes.
- (24) Capítulo C.48 do presente anexo, Ensaio de reprodução a curto prazo em peixes.
- (25) Capítulo C.47 do presente anexo, Ensaio de toxicidade nos primeiros estádios de vida em peixes.

- (26) Capítulo C.49 do presente anexo, Ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET).
- (27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245-251.
- (31) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Comprimento à furca (CF): O comprimento medido da extremidade do focinho até à extremidade dos raios centrais da barbatana caudal, utilizado nos peixes quando é difícil perceber onde termina a coluna vertebral (www.fishbase.org).

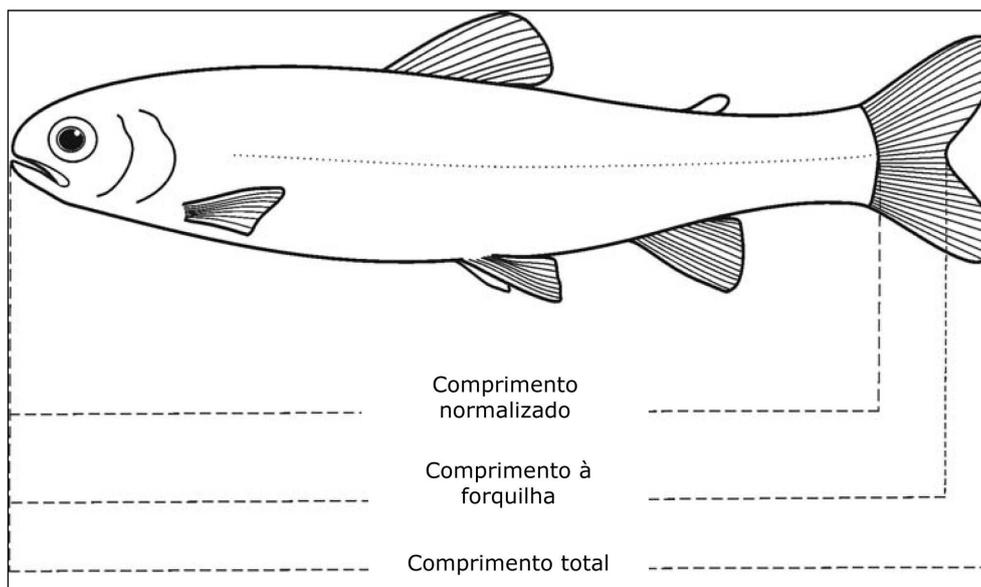
Comprimento normalizado (CN): O comprimento do peixe medido da extremidade do focinho até à extremidade posterior da última vértebra ou à extremidade posterior da parte lateral média da placa hipural. Por outras palavras, esta medida exclui o comprimento da barbatana caudal (www.fishbase.org).

Comprimento total (CT): O comprimento da extremidade do focinho até à extremidade do lobo mais longo da barbatana caudal, normalmente medido com os lobos espalmados no prolongamento da linha média. A medida faz-se em linha reta, sem seguir a curva do corpo (www.fishbase.org).

Uma imagem idêntica era apresentada na anterior alteração ao REG 440/2008 (ENV-2016-80003, parte 4), capítulo C.47, Apêndice 1, e pode ser reutilizada

Figura 1

Descrição dos diferentes comprimentos utilizados



CEx (Concentração efetiva com x % de efeito): concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente a um grupo de controlo. Por exemplo, a CE50 é a concentração estimada que produz efeitos num parâmetro do ensaio em 50 % de uma população exposta durante um determinado período de exposição.

Concentração mínima com efeito observável (LOEC): A menor concentração de ensaio de um produto químico em estudo para a qual se observa um efeito significativo (a $p < 0,05$), comparativamente com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior aos observados com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, conseqüentemente, a NOEC). Os apêndices 5 e 6 contêm orientações neste domínio.

Concentração letal média (CL50): A concentração de um produto químico em estudo que se estima ser letal para 50 % dos organismos sujeitos ao ensaio durante o ensaio.

Concentração sem efeito observável (NOEC): A concentração de ensaio imediatamente abaixo da LOEC que, comparativamente ao grupo de controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), num determinado período de exposição.

Densidade de ocupação: Número de peixes por volume de água.

Ensaio de fluxo contínuo: Ensaio com fluxo contínuo de soluções de ensaio através do sistema de ensaio durante o período de exposição.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

IACUC: Comité Institucional para o Cuidado e a Utilização de Animais.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

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

SMILES: Especificação de escrita molecular linear simplificada (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

spf: Semanas após a fertilização.

Taxa de carga: Peso húmido de peixe por volume de água.

Taxa de eclosão: Número de alevins/embriões carregados numa incubadora

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

VTG: A vitelogenina é uma fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo, que normalmente ocorre nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

Apêndice 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentração limite
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados totais e dos bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsénio	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

Apêndice 3

CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA O MEOGRT

1. Espécie recomendada	Peixe-do-arroz-japonês (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	A temperatura nominal de ensaio é de 25 °C. A temperatura média durante o ensaio em cada cuba é de 24-26 °C.
4. Qualidade da iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espectro largo e ~150 lúmenes/m ²) (~150 lux).
5. Fotoperíodo	16 h de luz e 8 h de escuridão
6. Taxa de carga	F0: 2 adultos/replicado; F1: iniciada com um máximo de 20 ovos (embriões)/replicado, reduzidos para 12 embriões/replicado na eclosão e, depois, 2 adultos (casal reprodutor XX-XY) às 9-10 spf para a fase de reprodução
7. Volume útil mínimo das câmaras de ensaio	1,8 l (exemplo de dimensão da câmara de ensaio: 18x9x15 cm)
8. Renovação da solução de ensaio, em volume	Máximo de 5 renovações em volume/dia até 16 renovações em volume/dia (ou débito de 20 ml/min)
9. Idade dos organismos de ensaio no início	F0: > 12 spf, não devendo, de preferência, exceder 16 spf
10. Número de organismos por replicado	F0: 2 peixes (par macho-fêmea); F1: máximo 20 peixes (ovos)/replicado (produzidos por casais reprodutores F0 e F1).
11. Número de tratamentos	5 tratamentos com o produto químico em estudo mais controlo(s) adequado(s)
12. Número de replicados por tratamento	Mínimo de 6 replicados por tratamento para o produto químico em estudo e mínimo de 12 replicados para o controlo, bem como para o controlo com solvente, se utilizado (o número de replicados é duplicado na fase de reprodução na geração F1)
13. Número de organismos por ensaio	Mínimo de 84 peixes na geração F0 e 504 na geração F1 (se for utilizado controlo com solvente, 108 peixes para F0 e 648 peixes para F1). A unidade contabilizada é o pós-eleuteroembrião.
14. Regime alimentar	Os peixes são alimentados <i>ad libitum</i> com <i>Artemia</i> spp. (náuplios com 24 horas de vida), complementadas, se necessário, com um alimento floculado disponível no mercado (o apêndice 6 contém um exemplo de um regime alimentar que garante um crescimento e um desenvolvimento adequados para uma reprodução sustentada).
15. Arejamento	Nenhum, exceto se o oxigénio dissolvido se aproximar de valores < 60 % do valor de saturação no ar
16. Água de diluição	Água limpa de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada.

17. Período de exposição Em princípio 19 semanas (da F0 à eclosão da F2)
18. Parâmetros biológicos (primários) Taxa de eclosão (F1 e F2); sobrevivência (F1, desde a eclosão até 4 spf (fim das larvas/início dos juvenis), entre 4 e 9 (ou 10) spf (início de juvenis até subadultos) e entre 9 e 15 spf (de subadultos até à eutanásia dos adultos)); crescimento (F1, comprimento e peso às 9 e 15 spf); características sexuais secundárias (F1, papilas da barbatana anal às 9 e 15 spf); vitelogenina (F1, ARNm vtg ou proteína VTG às 15 spf); sexo fenotípico (F1, via histologia das gónadas às 15 spf); reprodução (F0 e F1, fecundidade e fertilidade durante 21 dias); tempo até à desova (F1) e histopatologia (F1, gónada, fígado e rins às 15 spf)
19. Critérios de validade do ensaio Oxigénio dissolvido $\geq 60\%$ do valor da saturação no ar; temperatura média da água de 24-26 °C durante todo o ensaio; reprodução bem-sucedida $\geq 65\%$ de fêmeas no(s) controlo(s); fecundidade média diária ≥ 20 ovos no(s) controlo(s); taxa de eclosão $\geq 80\%$ (média) nos controlos (em cada uma das gerações F1 e F2); sobrevivência após a eclosão até às 3 spf $\geq 80\%$ (média) e a partir das 3 spf até à eutanásia para a geração $\geq 90\%$ (média) nos controlos (F1), as concentrações do produto químico em estudo em solução devem ser mantidas satisfatoriamente dentro de um intervalo de $\pm 20\%$ em relação aos valores médios medidos.

Apêndice 4

ORIENTAÇÕES SOBRE OS VALORES TÍPICOS OBTIDOS NOS CONTROLOS

Note-se que os valores seguintes obtidos nos controlos se baseiam num número limitado de estudos de validação, podendo ser alterados à luz da nova experiência adquirida.

Crescimento

O peso e o comprimento são medidos para todos os peixes amostrados às 9 (ou 10) e às 15 semanas pós-fecundação (spf). De acordo com este protocolo, o peso húmido previsto às 9 spf é de 85-145 mg, para os machos, e de 95-150 mg, para as fêmeas. O peso esperado às 15 spf é de 250-330 mg para os machos e de 280-350 mg para as fêmeas. Embora se possam registar desvios significativos em relação a estes intervalos para determinados peixes, um peso médio nos controlos que se afaste substancialmente destes intervalos, sobretudo se for inferior, sugere problemas relacionados com a alimentação, o controlo da temperatura, a qualidade da água, doenças ou uma combinação destes fatores.

Eclosão

A taxa de eclosão nos controlos é tipicamente de cerca de 90 %. No entanto, não são raros valores próximos dos 80 %. Uma taxa de eclosão inferior a 75 % pode indicar uma agitação insuficiente dos ovos durante o desenvolvimento ou cuidados insuficientes no seu manuseamento, como a remoção tardia dos ovos mortos, que leva a uma infestação fúngica.

Sobrevivência

As taxas de sobrevivência até às 3 spf após a eclosão e após 3 spf são, em geral, de 90 % ou mais para os controlos, mas não são excessivas as taxas de sobrevivência próximas dos 80 % nas fases iniciais de vida, para os controlos. As taxas de sobrevivência em controlos inferiores a 80 % são motivo de preocupação e podem indicar uma limpeza insuficiente dos aquários, conduzindo à perda de larvas por doença ou asfixia devido aos baixos níveis de oxigénio dissolvido. A mortalidade pode também resultar de lesões durante a limpeza das cubas e da perda de larvas no sistema de drenagem das cubas.

Gene da vitelogenina

Embora os níveis absolutos do gene da vitelogenina (*vtg*), expressos em cópias/ng de ARNm total, possam variar consideravelmente entre laboratórios devido aos procedimentos ou instrumentos utilizados, o rácio de *vtg* deve ser cerca de 200 vezes superior nas fêmeas de controlo em relação aos machos de controlo. Não é invulgar que este rácio atinja níveis de 1 000 a 2 000; contudo, rácios inferiores a 200 são suspeitos e podem indicar problemas de contaminação das amostras ou problemas ligados ao procedimento e/ou aos reagentes utilizados.

Características sexuais secundárias

Para os machos, o intervalo normal de características sexuais secundárias, definidas como o número total de segmentos com papilas nos raios da barbatana anal, é de 40-80 segmentos às 9-10 spf. Às 15 spf, o intervalo deve ser de cerca de 80-120, para os machos de controlo, e de 0, para as fêmeas de controlo. Por motivos não elucidados, em casos raros, alguns machos não apresentam papilas às 9 spf, mas como todos os machos de controlo desenvolvem papilas até às 15 spf, tal resulta provavelmente de um atraso no desenvolvimento. A presença de papilas nas fêmeas de controlo indica a presença de machos XX na população.

Machos XX

A incidência normal de machos XX nos peixes de cultura parece ser, no máximo, da ordem dos 4 %, a 25 °C, aumentando a incidência com o aumento da temperatura. Devem tomar-se medidas para limitar a proporção de machos XX na população. Uma vez que a incidência destes parece ter um componente genético e é, por conseguinte, hereditária, um meio eficaz de reduzir a sua incidência na população consiste em vigiar a população da cultura e assegurar que os machos XX não são utilizados para reprodução.

Atividade de desova

A atividade de desova nos replicados de controlo deve ser monitorizada diariamente antes da avaliação da fecundidade. Os casais de controlo podem ser avaliados visualmente do ponto de vista qualitativo para evidência da atividade de reprodução. Às 12-14 spf, a maioria dos casais de controlo deve desovar. Um número reduzido de casais a desovar nesta altura indica possíveis problemas de saúde, maturidade ou bem-estar dos peixes.

Fecundidade

Às 12-14 spf, as fêmeas do peixe-do-arroz-japonês de boa saúde e bem alimentadas põem geralmente 15 a 50 ovos por dia. A produção de ovos recomendada para 16 dos 24 casais reprodutores de controlo (> 65 %) deve exceder os 20 ovos por casal, por dia, podendo atingir cerca de 40 ovos por dia. Uma produção inferior pode indicar problemas de imaturidade, de malnutrição ou de falta de saúde dos casais reprodutores.

Fertilidade

A percentagem de ovos férteis nos casais reprodutores de controlo é geralmente da ordem dos 90 %, não sendo raros valores de 95 % ou superiores. As taxas de fertilidade inferiores a 80 % nos ovos de controlo são suspeitas e podem indicar indivíduos não saudáveis ou condições de cultura inferiores ao desejável.

Apêndice 5

EXEMPLO DE REGIME ALIMENTAR

O quadro 1 apresenta um regime alimentar que assegura um crescimento e um desenvolvimento adequados para uma reprodução sustentada. São aceitáveis eventuais desvios a este regime alimentar, mas recomenda-se que sejam testados para verificar se as taxas de crescimento e de reprodução são aceitáveis. Para aplicar o regime alimentar proposto, é necessário, antes do início do ensaio, determinar o peso enxuto de artémias por volume de pasta semilíquida das mesmas. Isso pode ser feito pesando um determinado volume desta pasta após tê-la secado durante 24 horas a 60 °C em recipientes previamente pesados. Para ter em conta o peso dos sais na pasta semilíquida, convém secar e pesar também um volume idêntico da solução salina utilizada na pasta semilíquida, e subtrair o peso do sal do peso obtido para a pasta de artémias seca. Uma alternativa consiste em filtrar e enxaguar as artémias com água destilada antes de as secar, eliminando assim a necessidade de medir o peso de uma amostra que contenha apenas sal. Esta informação é utilizada para converter as informações do quadro de peso enxuto de artémias em volume de puré semilíquido de artémias a administrar aos peixes. Além disso, recomenda-se que sejam pesadas, todas as semanas, as alíquotas de pasta de artémias para verificar se o peso enxuto administrado está correto.

Quadro 1

Exemplo de regime alimentar

Tempo (após a eclosão)	Artémias (mg peso enxuto/peixe/dia)
Dia 1	0,5
Dia 2	0,5
Dia 3	0,6
Dia 4	0,7
Dia 5	0,8
Dia 6	1,0
Dia 7	1,3
Dia 8	1,7
Dia 9	2,2
Dia 10	2,8
Dia 11	3,5
Dia 12	4,2
Dia 13	4,5

Tempo (após a eclosão)	Artémias (mg peso enxuto/peixe/dia)
Dia 14	4,8
Dia 15	5,2
Dias 16-21	5,6
Semana 4	7,7
Semana 5	9,0
Semana 6	11,0
Semana 7	13,5
Semana 8-eutanásia	22,5

Apêndice 6

EXEMPLOS DE CÂMARAS DE INCUBAÇÃO DE OVOS

Exemplo A



Esta incubadora é constituída por um tubo de centrifugação de vidro com um corte transversal, ligado por uma manga de aço inoxidável e sustido pela tampa de rosca da centrifugadora. Um pequeno tubo em vidro ou em aço inoxidável atravessa a tampa e é posicionado perto do fundo redondo, garantindo uma difusão suave das bolhas de ar para colocar os ovos em suspensão e reduzir a transmissão entre os ovos de infeções fúngicas por organismos saprofiticos e facilitando simultaneamente as trocas químicas entre a incubadora e a cuba onde está colocada.

Exemplo B





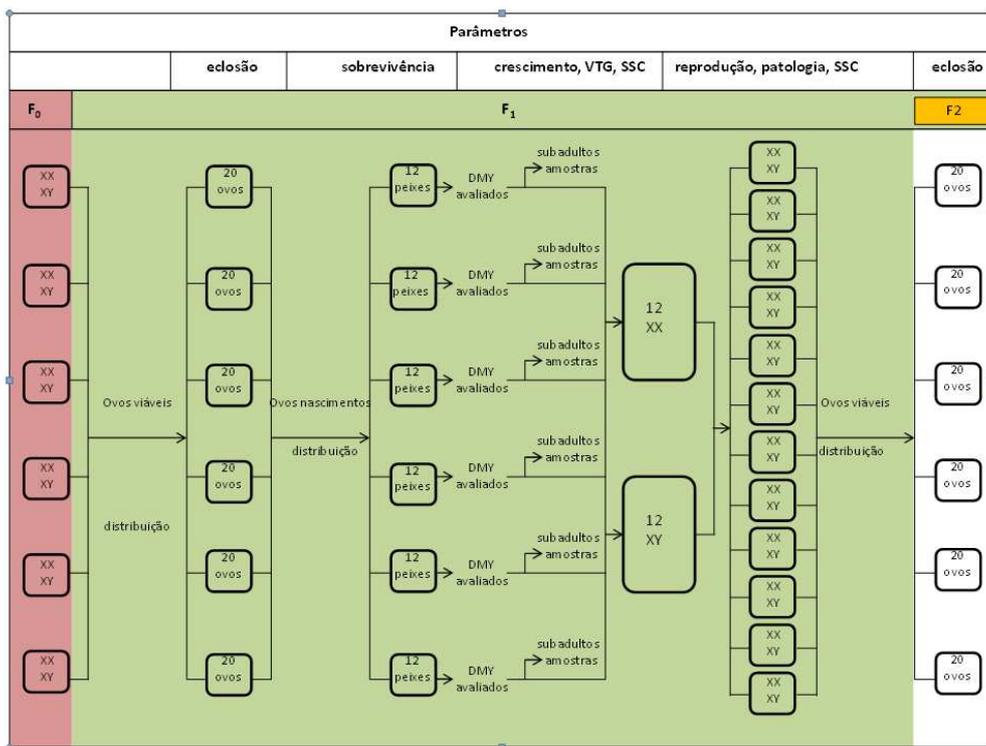
Esta incubadora é constituída por um corpo cilíndrico de vidro (5 cm de diâmetro e 10 cm de altura) e por uma grelha metálica em aço inoxidável (0,25 ϕ e 32 mesh), mantida no fundo do corpo cilíndrico com um anel em PTFE. As incubadoras são suspensas por uma barra de movimento vertical sobre as cubas e agitadas verticalmente (aproximadamente 5 cm de amplitude) num ciclo adequado aos ovos de peixe-do-arroz-japonês (aproximadamente uma vez a cada 4 segundos).

Apêndice 7

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO AGRUPAMENTO E DA REPARTIÇÃO DE REPLICADOS DURANTE O MÉTODO DE ENSAIO MEOGRT

Figura 1

Agrupamento e repartição de replicados durante o MEOGRT. A figura representa um tratamento ou 1/2 controlo. Devido ao agrupamento, a identidade dos replicados não é contínua ao longo do ensaio. Note-se que o termo «ovos» designa ovos fecundados viáveis (equivalente a embriões)



Tratamentos e replicação

O presente método de ensaio recomenda cinco tratamentos com o produto químico em estudo utilizando material de qualidade técnica e um controlo negativo. O número de replicados por tratamento não se mantém constante ao longo do MEOGRT e o número de replicados no grupo de controlo é duas vezes mais elevado do que em qualquer um dos grupos de tratamento. Na geração F0, cada grupo tratado com o produto químico em estudo compreende seis replicados, ao passo que o grupo de controlo negativo tem 12 replicados. O recurso a solventes é fortemente desaconselhado, mas, se forem utilizados, essa utilização e a escolha do solvente devem justificar-se no relatório de ensaio. Além disso, se for utilizado um solvente, são necessários dois tipos de controlos: a) um controlo com solvente e b) um controlo negativo. Estes dois grupos de controlo devem conter, cada um deles, todos os replicados previstos nas diferentes etapas do ensaio MEOGRT. Esta estrutura de replicação permanece inalterada durante todo o desenvolvimento do organismo de ensaio na geração F1 (e F2 até a eclosão). No entanto, na fase adulta, quando os casais reprodutores F1 são constituídos, o número de replicados de casais reprodutores por tratamento deve ser duplicado para otimizar os resultados; por conseguinte, existem até 12 casais replicados por grupo tratado com o produto químico em estudo e 24 casais replicados no grupo de controlo (assim como 24 casais replicados no grupo de controlo com solvente, se necessário). A determinação da eclosão dos embriões reproduzidos pelos casais F1 é efetuada com base na mesma estrutura de replicação utilizada para os embriões dos casais F0, ou seja, inicialmente seis replicados por grupo tratado pelo produto químico em estudo e 12 replicados no(s) grupo(s) de controlo.

Apêndice 8

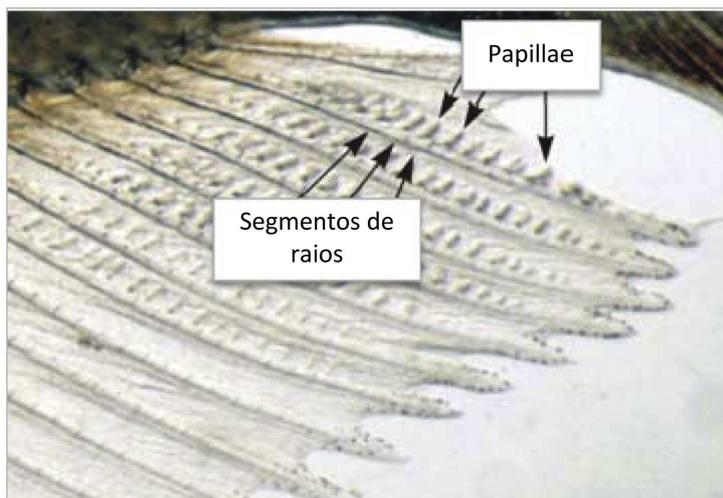
CONTAGEM DAS PAPILAS DA BARBATANA ANAL

Principais materiais e reagentes

- Microscópio de dissecação (com câmara fotográfica facultativa);
- Fixador (por exemplo, de Davidson (o líquido de Bouin não é recomendado), se a contagem não for efetuada por imagem

Procedimentos

Após a necrópsia, convém obter uma imagem da barbatana anal de modo a permitir a contagem conveniente das papilas. Embora a imagiologia seja o método recomendado, a barbatana pode ser fixada com fixador de Davidson ou outro fixador adequado, durante cerca de 1 minuto. É importante mantê-la espalmada durante a fixação, para facilitar a contagem das papilas. A carcaça com a barbatana anal pode ser armazenada em fixador de Davidson ou noutro fixador adequado, até ser analisada. Contar o número de placas de junção (ver **figura 1**) com papilas salientes ao nível do rebordo posterior da placa.

*Figura 1***Papilas da barbatana anal**

Apêndice 9

CRONOLOGIA PORMENORIZADA DO ENSAIO MEOGRT

Semanas de ensaio 1-3 (F0)

Os peixes reprodutores da geração F0 que tenham cumprido os critérios de seleção (ver pontos 16 a 20) são expostos durante três semanas, para permitir a exposição dos gametas e dos tecidos gonadais em desenvolvimento ao produto químico em estudo. Cada cuba replicada contém um único casal reprodutor (casal fêmea XX-macho XY). Os ovos postos são recolhidos, contados e avaliados para efeitos de fertilidade durante 21 dias consecutivos, a partir do 1.º dia de ensaio.

Semana de ensaio 4 (F0 e F1)

É preferível que os ovos fecundados e viáveis (embriões) sejam recolhidos num único dia; no entanto, se não existirem embriões suficientes, podem ser recolhidos em dois dias. Neste caso, todos os embriões do mesmo tratamento que tenham sido recolhidos no primeiro dia são agrupados com os embriões recolhidos no segundo dia. Em seguida, a totalidade dos embriões agrupados para cada tratamento é distribuída aleatoriamente pelas incubadoras de replicação, a uma razão de 20 embriões por incubadora. A mortalidade dos ovos fecundados (embriões) é verificada e registada diariamente. Os ovos mortos são removidos das incubadoras (a morte de ovos fecundados pode ser identificada, em especial numa fase precoce, por uma diminuição acentuada da transparência e por uma alteração da coloração provocadas pela coagulação e/ou precipitação de proteínas, que se traduz num aspeto branco opaco; OCDE 2010).

Nota: Se um único tratamento exigir um segundo dia de colheita, todos os tratamentos (incluindo os controlos) têm de seguir este procedimento. Se, após o segundo dia de colheita, o número de embriões no âmbito de um tratamento não for suficiente para permitir colocar 20 embriões por incubadora, reduz-se para 15 o número de embriões por incubadora nesse tratamento específico. Se não houver embriões suficientes para colocar 15 por incubadora, reduz-se o número de incubadoras de replicação até que haja embriões em número suficiente para colocar 15 por incubadora. Além disso, é possível aumentar o número de casais reprodutores por tratamento e por grupo de controlo, na geração F0, para produzir mais ovos e alcançar o número recomendado de 20 por replicado.

No 24.º dia de ensaio, os casais reprodutores F0 são eutanasiados, registando-se o seu peso e o seu comprimento. Se necessário, é possível proporcionar mais um ou dois dias aos casais reprodutores F0, a fim de recomeçar a geração F1.

Semanas de ensaio 5-6 (F1)

Um ou dois dias antes do início previsto da eclosão, deve-se parar ou reduzir a agitação dos ovos em incubação para acelerar aquele processo. À medida que os ovos vão eclodindo, dia após dia, os alevins são agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática pelas cubas de replicação destinadas às larvas no âmbito de cada tratamento específico, sendo que cada cuba não deve conter mais de 12 alevins. A distribuição é efetuada de forma aleatória; selecionam-se os alevins, que são colocados um a um em replicados sucessivos de forma aleatória e passando pela mesma ordem de um replicado de tratamento para o seguinte, até que todos os replicados no âmbito do tratamento tenham 12 alevins. Se não houver um número suficiente de alevins para preencher todos os replicados, é necessário garantir que o maior número possível de replicados contém 12 alevins para iniciar a fase F1.

Os ovos que não tenham eclodido ao fim de um período duplo do dia de eclosão médio no controlo são considerados não viáveis e rejeitados. O número de alevins é registado, calculando-se o êxito da eclosão (taxa de eclosão) em cada replicado.

Semanas de ensaio 7-11 (F1)

A sobrevivência das larvas é controlada e registada diariamente em todos os replicados. Ao 43.º dia de ensaio, regista-se o número de peixes sobreviventes em cada replicado, bem como o número inicial de alevins colocados no replicado (valor nominal: doze). Deste modo, é possível calcular a percentagem de sobrevivência desde a eclosão até à fase subadulta.

Semana de ensaio 12 (F1)

Entre o 78.º e o 85.º dia de ensaio, retira-se uma pequena amostra da barbatana caudal de cada peixe para determinar o sexo genotípico do indivíduo. Estes dados são utilizados para constituir os casais reprodutores.

Nos três dias seguintes à determinação do sexo genotípico de cada peixe, constituem-se, aleatoriamente, 12 casais reprodutores por tratamento e 24 casais por controlo. Dois peixes XX e XY de cada replicado são selecionados aleatoriamente e agrupados por sexo e, em seguida, selecionados aleatoriamente para constituir os casais reprodutores (casais XX-XY). São constituídos, no mínimo, 12 replicados por tratamento e, no mínimo, 24 replicados para os controlos, com um casal reprodutor por replicado. Se, num replicado, não for possível agrupar dois peixes XX ou dois peixes XY, devem colocar-se peixes com o sexo genotípico adequado noutros replicados no âmbito do tratamento.

Os restantes peixes (máximo de 8 peixes por replicado) são eutanasiados e amostrados para a medição dos vários parâmetros na fase subadulta. Os dados relativos ao gene *dmy* (XX ou XY), para todas as amostras subadultas, são conservados com vista a garantir a possibilidade de associar todos os parâmetros medidos ao sexo genético de cada indivíduo.

Semanas de ensaio 13-14 (F1)

A exposição prossegue à medida que os casais reprodutores subadultos evoluem até à fase adulta. No 98.º dia de ensaio (ou seja, no dia anterior ao início da colheita dos ovos), os ovos são retirados dos aquários e das fêmeas.

Semanas de ensaio 15-17 (F1)

Os ovos postos são recolhidos diariamente durante 21 dias consecutivos em cada replicado e avaliados quanto à fecundidade e à fertilidade.

Semana de ensaio 18 (repetição da semana de ensaio 4) (F1 e F2)

No 120.º dia de ensaio, durante a manhã, procede-se à colheita dos ovos em cada cuba replicada. Os ovos recolhidos são avaliados e os ovos fecundados (filamentos removidos) de cada um dos casais reprodutores são agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática pelas câmaras de incubação, com 20 ovos fecundados por incubadora. Estas podem ser colocadas em cubas para incubadoras, disponibilizadas para cada tratamento, ou na cuba replicada, que conterà as larvas após a eclosão. É preferível que os embriões sejam recolhidos num único dia; no entanto, se não existirem embriões suficientes, podem ser recolhidos em dois dias. Neste caso, todos os embriões do mesmo tratamento que tenham sido recolhidos no primeiro dia são agrupados com os embriões recolhidos no segundo dia. Em seguida, a totalidade dos embriões assim agrupados para cada tratamento é distribuída aleatoriamente pelas incubadoras de replicação, a uma razão de 20 embriões por incubadora. Se um único tratamento exigir um segundo dia de colheita, todos os tratamentos (inclusive os controlos) têm de seguir este procedimento. Se, após o segundo dia de colheita, o número de embriões no âmbito de um tratamento não for suficiente para permitir colocar 20 embriões por incubadora, reduz-se para 15 o número de embriões nesse tratamento específico. Se não houver embriões suficientes para carregar 15 por incubadora, reduz-se o número de incubadoras de replicação até que haja embriões suficientes para carregar 15 por incubadora.

No 121.º dia de ensaio (ou no 122.º dia de ensaio, para garantir o início correto da F2), os casais reprodutores F1 são eutanasiados e analisados quanto aos parâmetros na fase adulta. Se necessário, é possível proporcionar mais um ou dois dias aos casais reprodutores F1, a fim de recomençar a geração F2.

Semanas de ensaio 19-20 (F2)

Um ou dois dias antes do início previsto da eclosão, deve-se parar ou reduzir a agitação dos ovos em incubação para acelerar aquele processo. Se o ensaio terminar com a eclosão da geração F2, os alevins são contados todos os dias e rejeitados. Os embriões que não tenham eclodido após um período de incubação prolongado, definido como duas vezes o tempo médio da eclosão nos controlos, são considerados não viáveis.

Apêndice 10

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tipos de dados biológicos gerados aquando do ensaio MEOGRT não são específicos deste ensaio; com exceção dos dados de patologia, foram desenvolvidos muitos métodos estatísticos adequados para analisar corretamente dados semelhantes em função das respetivas características, incluindo a normalidade, a homogeneidade da variância, se a conceção do estudo se presta a testes de hipótese ou análises de regressão, ensaios paramétricos *versus* ensaios não paramétricos, etc. Regra geral, as análises estatísticas propostas respeitam as recomendações da OCDE em matéria de dados de ecotoxicidade (OCDE 2006). A figura 2 apresenta um fluxograma decisional para a análise dos dados do ensaio MEOGRT.

Parte-se do princípio de que, na maior parte dos casos, os conjuntos de dados proporcionam respostas monótonas. Além disso, há que ponderar se deve ser utilizado um teste estatístico unilateral ou um teste estatístico bilateral. Sugere-se a utilização de testes unilaterais, a menos que isso não seja adequado por motivos biológicos. Embora a secção seguinte recomende determinados testes estatísticos específicos, se forem estabelecidos métodos estatísticos mais adequados e/ou potentes para aplicação aos dados específicos gerados pelo MEOGRT, esses testes estatísticos devem ser utilizados para beneficiar das vantagens que apresentam.

Os dados MEOGRT devem ser analisados separadamente para cada sexo genotípico. Existem duas estratégias para analisar os dados relativos aos peixes que apresentem inversão sexual (machos XX ou fêmeas XY): 1) Excluir todos os dados relativos aos peixes que apresentem uma inversão sexual ao longo de todo o ensaio, exceto no que se refere à prevalência da inversão sexual em cada replicado; 2) Conservar os dados relativos aos peixes que apresentem uma inversão sexual e proceder à análise com base no sexo genotípico.

Dados histopatológicos

Os dados histopatológicos são registados sob a forma de índices de gravidade, que são avaliados utilizando um procedimento estatístico recentemente desenvolvido – *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices* (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). O ajustamento *Rao-Scott* retém a informação relativa à replicação do ensaio; o procedimento *by Slices* incorpora o pressuposto biológico de que a gravidade dos efeitos tende a aumentar com as concentrações de exposição. Para cada diagnóstico, os resultados do RSCABS indicam os tratamentos que induzem uma prevalência de patologias acrescida em relação aos controlos, bem como o respetivo o grau de gravidade.

Dados relativos à fecundidade

A análise dos dados relativos à fecundidade consiste num procedimento descendente (teste de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) para determinar os efeitos do tratamento, desde que os dados sejam compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona. O procedimento descendente permite fazer comparações a um nível de significância de 0,05, evitando os ajustamentos ligados ao número de comparações efetuadas. Espera-se que os dados sejam compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona, o que pode verificar-se quer através de uma inspeção visual dos dados, quer através da construção de contrastes lineares e quadráticos das médias por tratamento, após uma hierarquização dos dados. A menos que o contraste quadrático seja significativo e o contraste linear não o seja, realiza-se um ensaio de tendências. Caso contrário, recorre-se ao teste de Dunnett para determinar os efeitos dos tratamentos se os dados apresentarem uma distribuição normal e variâncias homogêneas. Se estes requisitos não forem cumpridos, utiliza-se o teste de Dunn com um ajustamento de Bonferroni-Holm. Todos os ensaios são realizados independentemente do teste global F ou de Kruskal-Wallis. Para mais informações, consultar o documento OCDE 2006.

Podem utilizar-se métodos alternativos, como um modelo linear generalizado com erros de Poisson para as contagens de ovos (sem transformação), desde que isso se justifique do ponto de vista estatístico (Cameron e Trividi, 2013). Neste caso, recomenda-se o recurso a um especialista em estatística.

Contagem diária de ovos numa única geração

O modelo ANOVA traduz-se na expressão $Y = \text{tempo} \times \text{tempo} + \text{tratamento} + \text{tratamento} \times \text{tempo} + \text{tempo} \times \text{tratamento} + \text{tempo} \times \text{tratamento}$, com os efeitos aleatórios do replicado (geração \times tratamento) e tempo \times replicado (tratamento), permitindo diferenças componentes de variâncias desiguais de ambos os tipos entre gerações. O termo «tempo» refere-se à frequência das contagens dos ovos (por exemplo, dia ou semana). Trata-se de uma análise de medidas repetidas, em que a correlação entre as observações realizadas com os mesmos replicados dá conta da natureza dos dados enquanto medidas repetidas.

Os principais efeitos dos tratamentos são submetidos ao teste de Dunnett (ou Dunnett-Hsu), que permite ajustar o número de comparações. Estes ajustamentos são necessários para os fatores geração e tempo, uma vez que nenhum deles está associado ao nível do «controle» e cada par de níveis é potencialmente interessante em termos de comparação. Em ambos os casos, se o teste F para o efeito principal for significativo ao nível 0,05, as comparações por pares entre níveis desse fator podem ser testadas ao nível 0,05 sem ajustamentos suplementares.

O modelo inclui interações a dois ou três fatores, pelo que um efeito principal para o tempo, por exemplo, pode não ser significativo, mesmo que o tempo tenha um impacto significativo nos resultados. Assim, se uma interação a dois ou três fatores que inclua o tempo for significativa ao nível 0,05, podem aceitar-se comparações de níveis de tempo ao nível de significância de 0,05 sem ajustamentos suplementares.

Seguem-se os testes F para a significância do tratamento no tempo, ou seja, as chamadas «fatias» (*slices*) no quadro ANOVA. Se, por exemplo, a fatia correspondente ao tratamento aplicada à geração F1 e ao tempo 12 for significativa ao nível 0,05, as comparações por pares dos tratamentos aplicados à geração F1 e ao tempo 12 podem ser aceites ao nível 0,05 sem mais ajustamentos. Aplicam-se regras semelhantes aos testes relativos ao tempo na geração F1 no âmbito de um tratamento, ou à geração associada a um tempo e a um determinado tratamento.

Por último, as comparações não abrangidas por nenhuma das categorias supramencionadas devem ser ajustadas pelo método de ajustamento dos valores p de Bonferroni-Holm. Para mais informações sobre a análise com esses modelos, consultar Hocking (1985) e Hochberg e Tamhane (1987).

Outro método consiste em recolher os dados brutos e apresentá-los, no relatório do estudo, na forma de fecundidade (número de ovos) por replicado e por dia. Calcula-se a média dos dados brutos por replicado, aplicando-se em seguida, uma transformação de raiz quadrada. Calcula-se uma ANOVA unidirecional aplicada às médias transformadas por replicado, seguida dos contrastes de Dunnett. Pode também ser útil inspecionar visualmente os dados da fecundidade de cada tratamento e/ou replicado num gráfico de pontos que represente a distribuição dos dados ao longo do tempo. Este método permitirá uma avaliação informal dos efeitos potenciais ao longo do tempo.

Todos os outros dados biológicos

As análises estatísticas baseiam-se no pressuposto de que, com uma seleção adequada das doses, os dados serão monótonos. Assim, os dados são assumidos como monótonos, monotonia essa que é formalmente avaliada por recurso a contrastes lineares e quadráticos. Se os dados forem monótonos, recomenda-se a realização de um teste de tendência de Jonckheere-Terpstra sobre as medianas dos replicados (conforme aconselhado em OCDE 2006). Se o contraste quadrático for significativo e o contraste linear não o for, os dados são considerados não monótonos.

Se os dados não forem monótonos, nomeadamente devido a uma resposta reduzida para o tratamento mais elevado ou os dois tratamentos mais elevados, deve ponderar-se excluir todo conjunto de dados, sendo a análise seja efetuada sem esses tratamentos. A decisão terá de ser tomada com base em critérios profissionais e relativamente a todos os dados disponíveis, em especial aqueles que indiquem toxicidade manifesta aos níveis de tratamento em causa.

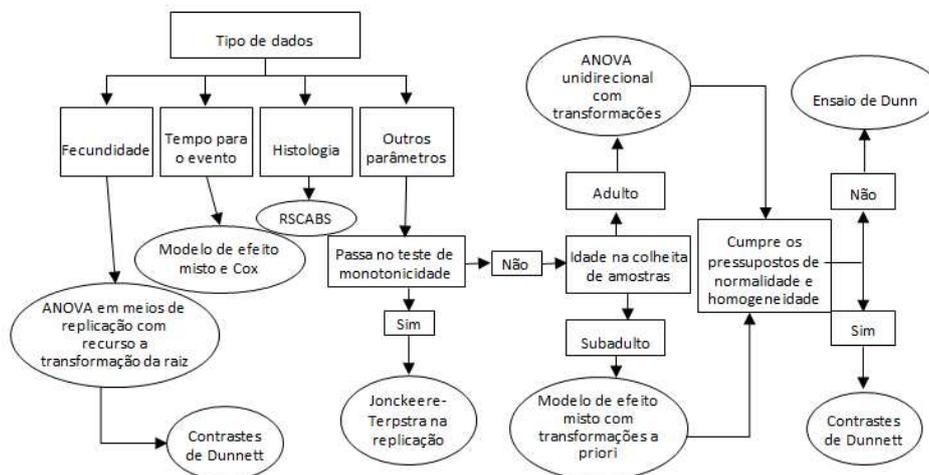
Quanto ao peso e ao comprimento, não são recomendadas transformações, embora possam ser ocasionalmente necessárias. No entanto, recomenda-se aplicar uma transformação logarítmica aos dados relativos à vitelogenina, uma transformação de raiz quadrada aos dados das CSS (papilas da barbatana anal) e uma transformação de arco seno da raiz quadrada aos dados relativos à taxa de eclosão, à percentagem de sobrevivência, ao rácio sexual e à percentagem de ovos férteis. O tempo até à eclosão e o tempo até à primeira desova devem ser tratados como tempo até ao evento, e os embriões que não ecludam no período definido, bem como os replicados que nunca desovam, devem ser tratados como dados censurados à direita. O tempo até à eclosão deve calcular-se a partir do dia mediano de eclosão de cada replicado. Estes parâmetros devem ser analisados com um modelo de riscos proporcionais de Cox para efeitos mistos.

Os dados biológicos de amostras de adultos são medidos uma vez por replicado, dado existir um peixe XX e um peixe XY por aquário replicado. Por conseguinte, recomenda-se que se aplique uma ANOVA unidirecional às médias dos replicados. Se se verificarem os pressupostos da ANOVA (normalidade e homogeneidade das variâncias – avaliadas, no que diz respeito aos resíduos da ANOVA, pelo teste de Shapiro-Wilks e o teste de Levene, respetivamente), devem utilizar-se os contrastes de Dunnett para determinar os tratamentos que diferem do controlo. Por outro lado, se os pressupostos da ANOVA não se verificarem, deve recorrer-se a um teste de Dunn para determinar que tratamentos diferiram do controlo. Recomenda-se um procedimento semelhante para os dados na forma de percentagens (fertilidade, eclosão e sobrevivência).

Os dados biológicos das amostras de subadultos têm entre 1 e 8 medições por replicado, pelo que podem existir números variáveis de indivíduos que contribuem para a média do replicado de cada sexo genotípico. Por conseguinte, recomenda-se a utilização de um modelo ANOVA com efeitos mistos, seguido de contrastes de Dunnett, caso se verifiquem os pressupostos em matéria de normalidade e de homogeneidade das variâncias (no que diz respeito aos resíduos da ANOVA com efeitos mistos). Se tal não for o caso, deve proceder-se a um teste de Dunn para determinar os tratamentos que diferiram do controlo.

Figura 2

Fluxograma relativo aos procedimentos estatísticos recomendados para a análise dos dados MEOGRT



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, Nova Iorque. **[[G1]]C.53 ENSAIO DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE ANFÍBIOS (LAGDA)**

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente às orientações de ensaio n.º 241 da OCDE (2015). A necessidade de desenvolver e validar um ensaio capaz de identificar e caracterizar as consequências negativas da exposição a produtos químicos tóxicos nos anfíbios surgiu da preocupação de que os níveis ambientais dos produtos químicos possam causar efeitos nocivos nos seres humanos e na fauna selvagem. As orientações de ensaio da OCDE sobre o Ensaio de Crescimento e Desenvolvimento de Larvas de Anfíbios (LAGDA) descrevem um ensaio de toxicidade, realizado com uma espécie de anfíbios, que estuda o crescimento e o desenvolvimento desde a fecundação até ao período juvenil precoce. Trata-se de um ensaio – normalmente com a duração de 16 semanas – que avalia o desenvolvimento inicial, a metamorfose, a sobrevivência, o crescimento e a maturação parcial do sistema reprodutor. Permite, além disso, medir um conjunto de outros parâmetros com vista a uma avaliação diagnóstica de produtos químicos suspeitos de serem perturbadores endócrinos ou de outros tipos de substâncias com efeitos tóxicos para o desenvolvimento e para a reprodução. O método descrito no presente documento é inspirado em trabalhos de validação realizados sobre a rã-de-unhas-africana (*Xenopus laevis*) pela Agência de Proteção do Ambiente dos EUA (U.S. EPA), em cooperação com o Japão (1). Embora outras espécies de anfíbios possam ser adequadas a um protocolo de ensaio sobre o crescimento e o desenvolvimento com capacidade para determinar se o sexo genético é um elemento importante, os métodos e parâmetros específicos descritos no presente método de ensaio são aplicáveis apenas a *Xenopus laevis*.
2. O LAGDA é utilizado como ensaio de nível superior no anfíbio para recolher informações mais abrangentes sobre as relações concentração-resposta em matéria de efeitos nocivos, efeitos esses que podem ser úteis para a identificação e a caracterização dos perigos e para a avaliação do risco ecológico. O ensaio enquadra-se no nível 4 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos, uma vez que os ensaios *in vivo* também fornecem dados sobre efeitos nocivos com base nos parâmetros pertinentes do sistema endócrino (2). O plano experimental genérico implica a exposição de embriões de *X. laevis* na fase de desenvolvimento 8-10 de Nieuwkoop e Faber (NF) (3) a um mínimo de quatro concentrações diferentes do produto químico em estudo (geralmente espaçadas por intervalos definidos segundo uma progressão não logarítmica) e a um ou mais controlos, até 10 semanas após o tempo médio até à fase NF62 no controlo, com uma subamostra provisória na fase NF62 (\leq 45 dias pós-fecundação; normalmente cerca de 45 dpf). Cada concentração de ensaio é testada em quatro replicados, com oito replicados para controlo. Os parâmetros avaliados durante a exposição (na subamostra provisória e na amostra final no termo do ensaio) incluem os valores indicativos de toxicidade generalizada: mortalidade, comportamento anormal e determinantes de crescimento (comprimento e peso), bem como parâmetros destinados a caracterizar mecanismos de ação específicos dos desreguladores endócrinos que visam os processos fisiológicos mediados por estrogénios, por androgénios e pela tiroide. O método focaliza-se nos potenciais efeitos relevantes para uma população (nomeadamente impactos negativos na sobrevivência, no desenvolvimento, no crescimento e no desenvolvimento do sistema reprodutor), para calcular uma concentração sem efeitos observáveis (NOEC) ou uma concentração efetiva que provoca \times % de mudança (CE_x) no parâmetro medido. Importa notar que as abordagens do tipo CE_x só raramente são adequadas para grandes estudos deste tipo, em que o aumento do número de concentrações de ensaio para determinar a CE_x desejada pode ser inviável. De salientar também que o método não abrange a fase de reprodução propriamente dita. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Devido ao número limitado de produtos químicos testados e de laboratórios envolvidos na validação deste método de ensaio bastante complexo, sobretudo no que respeita à reprodutibilidade interlaboratorial – que ainda não se encontra documentada com dados experimentais –, prevê-se que, quando estiver disponível um número suficiente de trabalhos para determinar o impacto desta nova conceção, as orientações de ensaio 241 da OCDE serão reexaminadas e, se necessário, atualizadas à luz da experiência adquirida. O LAGDA é um ensaio importante que permite estudar os fatores suscetíveis de contribuir para um declínio da população de anfíbios, avaliando os efeitos da exposição a produtos químicos durante a fase larvar, em que os efeitos na sobrevivência e no desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento normal dos órgãos reprodutores, podem ter consequências nocivas nas populações.
4. O ensaio foi concebido para detetar o(s) efeito(s) apical(is) resultante(s) de mecanismos endócrinos e não endócrinos, e inclui parâmetros de diagnóstico que são, em parte, específicos dos principais mecanismos endócrinos. Importa notar que, até ao desenvolvimento do LAGDA, não existia nenhum ensaio validado que incidisse nesta função, para os anfíbios.
5. Antes do início do ensaio, é importante dispor de informações sobre as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, nomeadamente para garantir a estabilidade das soluções químicas produzidas. É também necessário dispor de um método analítico suficientemente sensível para verificar as concentrações do produto químico em estudo. O ensaio dura cerca de 16 semanas e requer um total de 480 animais, nomeadamente embriões de *X. laevis* (ou 640 embriões, caso se utilize um controlo com solvente), para garantir que é suficientemente representativo para avaliar os parâmetros ao nível da população, como o crescimento, o desenvolvimento e a maturação do sistema reprodutor.
6. Antes de utilizar o presente método de ensaio para testar uma mistura para fins regulamentares, convém averiguar se os resultados serão aceitáveis para a finalidade regulamentar pretendida. Além disso, o ensaio não avalia diretamente a fecundidade, podendo, por isso, não ser adequado para utilização numa fase mais avançada do que o nível 4 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos.

BASE CIENTÍFICA DO MÉTODO DE ENSAIO

7. Grande parte dos conhecimentos atuais sobre a biologia dos anfíbios foi obtida utilizando a espécie de laboratório modelo *X. laevis*. Esta espécie pode ser cultivada por rotina em laboratório; a ovulação pode ser induzida por gonadotropina coriônica humana (hCG) e é possível obter facilmente animais no comércio.
8. Tal como acontece com todos os vertebrados, a reprodução em anfíbios é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (4). Os estrogénios e os androgénios são mediadores deste sistema endócrino, controlando o desenvolvimento e a fisiologia dos tecidos sexualmente dimórficos. O ciclo de vida dos anfíbios divide-se em três fases distintas, durante as quais este eixo é particularmente ativo: (1) diferenciação das gónadas durante o desenvolvimento larvar, (2) desenvolvimento das características sexuais secundárias e maturação das gónadas durante a fase juvenil e (3) reprodução funcional dos adultos. Em cada uma destas três fases de desenvolvimento, o sistema endócrino é suscetível de ser perturbado por determinados produtos químicos, como estrogénios e androgénios, o que resulta, *in fine*, numa diminuição da capacidade reprodutiva dos organismos.
9. As gónadas começam a desenvolver-se na fase NF43, altura em que se forma a crista genital bipotencial. A diferenciação das gónadas começa na NF52, quando as células germinais primordiais migram para o tecido medular (machos) ou permanecem na região cortical (fêmeas) das gónadas em desenvolvimento (3). Na década de 1950, foi referido pela primeira vez que este processo de diferenciação sexual das gónadas de *Xenopus* é suscetível de ser alterado pela ação de produtos químicos (5) (6). A exposição dos girinos ao estradiol durante o período de diferenciação das gónadas provoca uma alteração do sexo nos machos, que se tornam fêmeas plenamente funcionais quando chegam à idade adulta (7) (8). A inversão funcional do sexo das fêmeas em machos também é possível, tendo

sido referida a sua ocorrência após a implantação de tecido testicular em girinos (9). No entanto, embora a exposição a um inibidor da aromatase provoque também uma inversão do sexo funcional em *X. tropicalis* (10), este efeito não foi constatado em *X. laevis*. Tradicionalmente, os efeitos de produtos tóxicos na diferenciação das gónadas eram avaliados através do exame histológico das gónadas no momento da metamorfose e a inversão do sexo só podia ser determinada pela análise dos rácios sexuais. Até há pouco tempo, não havia forma de determinar diretamente o sexo genético de *Xenopus*. No entanto, a criação recente de marcadores sexuais em *X. laevis* permite determinar o sexo genético e identificar diretamente os animais cujo sexo foi invertido (11).

10. Nos machos, o desenvolvimento juvenil acompanha o aumento dos níveis de testosterona no sangue, correspondente ao desenvolvimento de características sexuais secundárias, bem como ao desenvolvimento dos testículos. Nas fêmeas, o estradiol é produzido pelos ovários, o que resulta no aparecimento de vitelogenina (VTG) no plasma e de ovócitos vitelogénicos no ovário, assim como no desenvolvimento dos ovidutos (12). Os ovidutos são características sexuais secundárias femininas que intervêm na maturação dos ovócitos durante a reprodução. Os ovócitos são cobertos por um revestimento gelatinoso quando passam pelo oviduto e acumulam-se no ovissaco, prontos para serem fecundados. O desenvolvimento do oviduto parece ser regulado pelos estrogénios, uma vez que está correlacionado com os níveis de estradiol no sangue de *X. laevis* (13) e *X. tropicalis* (12). Foi referido o desenvolvimento de ovidutos nos machos expostos a bifenilos policlorados (14) e 4-*tert*-octilfenol (15).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. A conceção do ensaio implica expor os embriões de *X. laevis* na fase NF8-10, por via aquática, a quatro concentrações diferentes do produto químico em estudo e a um ou mais controlos até 10 semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 no controlo, com uma subamostra intermédia na fase NF62. Embora também seja possível administrar produtos químicos altamente hidrófobos através da alimentação, até à data esta via de exposição foi pouco explorada no contexto do presente ensaio. Cada concentração é testada em quatro replicados, com oito replicados para cada controlo utilizado. Os parâmetros avaliados durante a exposição incluem os indicadores de toxicidade generalizada – mortalidade, comportamento anormal e determinantes de crescimento (comprimento e peso) –, bem como parâmetros concebidos para caracterizar os mecanismos de ação dos perturbadores endócrinos que visam processos fisiológicos mediados pelos estrogénios, pelos androgénios ou pela tiroide (histopatologia da tiroide, histopatologia das gónadas e do ducto gonadal, desenvolvimento anormal, vitelogenina plasmática – opcional – e rácios sexuais genotípicos/fenotípicos).

CRITÉRIOS DE VALIDADE DO ENSAIO

12. São aplicáveis os seguintes critérios de validade do ensaio:

- A concentração de oxigénio dissolvido deve ser $\geq 40\%$ do valor da saturação no ar, durante todo o ensaio;
- A temperatura da água deve situar-se no intervalo de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder $1,0^\circ\text{C}$;
- O pH da solução de ensaio deve ser mantido entre 6,5 e 8,5, e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5;
- Os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo em solução foram corretamente mantidas num intervalo de $\pm 20\%$ em relação à média dos valores medidos;
- A mortalidade durante o período de exposição deve ser $\leq 20\%$ em cada replicado, no que diz respeito aos controlos;

- A viabilidade deve ser $\geq 70\%$ na desova escolhida para dar início ao estudo;
 - O tempo mediano até à fase NF62 nos controlos deve ser ≤ 45 dias.
 - O peso médio dos organismos de ensaio na fase NF62 e no fim do ensaio, no âmbito dos controlos e dos controlos com solvente (se utilizado), deve atingir, respetivamente, $1,0 \pm 0,2$ e $11,5 \pm 3$ g.
13. Embora não seja um critério de validade, recomenda-se que estejam disponíveis para análise, pelo menos, três níveis de tratamento, com três replicados não comprometidos. Uma mortalidade excessiva, que compromete um tratamento, é definida como a ocorrência de mais de quatro mortes ($> 20\%$) que não possam ser explicadas por um erro técnico em, pelo menos, dois replicados. A análise deve incluir, pelo menos, três níveis de tratamento isentos de toxicidade manifesta. Os sinais de toxicidade manifesta podem incluir, entre outros, a flutuação à superfície, a imobilização no fundo do viveiro, natação invertida ou irregular, falta de atividade à superfície e ausência de reação aos estímulos, anomalias morfológicas (por exemplo, deformidades nos membros), lesões hemorrágicas e edema abdominal.
14. Caso se observem desvios em relação aos critérios de validade do ensaio, devem ponderar-se as consequências no respeitante à fiabilidade dos resultados do ensaio, devendo esses desvios e a respetiva apreciação ser incluídos no relatório de ensaio.

DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Equipamento

15. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:
- a) Aparelhos de controlo da temperatura (por exemplo, aquecedores ou refrigeradores reguláveis a 21 ± 1 °C);
 - b) Termómetro;
 - c) Microscópio binocular de dissecação e ferramentas de dissecação;
 - d) Máquina fotográfica digital com resolução mínima de 4 megapixels e função micro (se necessário);
 - e) Balança analítica com precisão de 0,001 mg ou 1 µg;
 - f) Medidor de oxigénio dissolvido e medidor de pH;
 - g) Aparelho de medição da intensidade luminosa capaz de apresentar resultados em lux.

Água

Fonte e qualidade

16. Pode ser utilizada qualquer água de diluição disponível no local (por exemplo, água de nascente ou água da torneira filtrada com carvão) e permita o crescimento e desenvolvimento normais de *X. laevis*, devendo dispor-se de informações concretas que demonstrem o crescimento normal nesta água. Uma vez que a qualidade da água local pode diferir substancialmente de uma zona para outra, é necessário analisá-la, sobretudo no caso de não se dispor de dados históricos sobre a utilização da mesma na criação de larvas de anfíbios. Importa determinar o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , etc.), de pesticidas, de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão antes de iniciar o ensaio e/ou, por exemplo, de seis em seis meses, caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém relativamente constante. No apêndice 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

Concentração de iodeto na água utilizada no ensaio

17. Para que a glândula tiroide sintetize as hormonas que favorecem uma metamorfose normal, as larvas devem dispor de quantidades suficientes de iodeto proveniente de uma combinação de fontes aquosas e alimentares. Atualmente, não existem orientações empíricas quanto às concentrações mínimas de iodeto nos alimentos ou na água necessárias para garantir um desenvolvimento adequado. No entanto, a disponibilidade de iodetos pode afetar a capacidade de resposta do sistema tiróideo aos agentes ativos da tiroide e sabe-se que influencia a atividade basal da glândula tiroide, aspeto a ter em conta na interpretação dos resultados histopatológicos relativos à tiroide. Em trabalhos anteriores, demonstrou-se o bom desempenho do ensaio com concentrações de iodeto de água de diluição (Γ^-) compreendidas entre 0,5 e 10 $\mu\text{g/l}$. Idealmente, a concentração de iodeto (adicionado sob a forma de sal de sódio ou de potássio) na água de diluição, durante todo o ensaio, deve ser de 0,5 $\mu\text{g/l}$. Se a água for obtida por reconstituição de água desionizada, é necessário adicionar iodo de modo a obter uma concentração deste não inferior a 0,5 $\mu\text{g/l}$. É necessário mencionar no relatório as concentrações de iodetos medidas na água utilizada no ensaio (a água de diluição), bem como a adição de iodo ou outros sais (se for o caso) àquela água. Além de ser medido na água, pode também medir-se o teor de iodo nos alimentos.

Sistema de exposição

18. O ensaio foi concebido utilizando um sistema de diluição com fluxo contínuo. Os componentes do sistema devem ser constituídos por um material adaptado ao contacto com a água, como o vidro, o aço inoxidável e/ou outros materiais quimicamente inertes. Os viveiros de exposição devem ser aquários de vidro ou de aço inoxidável com um volume útil compreendido entre 4,0 e 10,0 l (profundidade mínima da água de 10 a 15 cm). O sistema deve ser capaz de suportar todas as concentrações de exposição, um controlo e um controlo com solvente, se necessário, com quatro replicados por tratamento e oito replicados para os controlos. O caudal deve ser constante em cada viveiro, a fim de garantir a estabilidade das condições biológicas e da exposição química. Recomenda-se que os caudais sejam adequados (no mínimo, 5 renovações por dia) para evitar declínios da concentração do produto químico, devido ao metabolismo dos organismos de ensaio e dos microrganismos aquáticos presentes nos aquários ou nas vias abióticas de degradação (hidrólise, fotólise) ou de dissipação (volatilização, sorção). Os viveiros devem ser dispostos de forma aleatória no sistema de exposição, de modo a reduzir os possíveis efeitos decorrentes da posição, como ligeiras variações de temperatura, intensidade luminosa, etc. Para mais informações sobre a montagem de sistemas de exposição de fluxo contínuo, consultar o guia da ASTM intitulado *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Introdução dos produtos químicos: preparação das soluções de ensaio

19. Para preparar as soluções de ensaio no sistema de exposição, convém introduzir neste uma solução-mãe do produto químico em estudo, com o auxílio de uma bomba adequada ou outro aparelho. O débito da solução-mãe deve ser calibrado de acordo com a confirmação analítica das soluções de ensaio antes do início da exposição, e deve ser objeto de controlo volumétrico periódico durante o ensaio. A solução de ensaio de cada viveiro deve ser renovada a uma taxa de pelo menos 5 renovações em volume/dia.

20. O método utilizado para introduzir o produto químico em estudo no sistema varia em função das suas propriedades físico-químicas. Por conseguinte, antes do ensaio, devem obter-se informações de base sobre o produto que sejam relevantes para determinar a sua estabilidade. No que respeita às propriedades específicas do produto químico em estudo, são úteis as seguintes informações: fórmula estrutural, peso molecular, pureza, estabilidade na água e à luz, pK_a e coeficiente de partição octanol-água, solubilidade em água (de preferência no meio de ensaio) e pressão de vapor, bem como os resultados de um ensaio de biodegradabilidade fácil – método de ensaio C.4 (17) ou C.29 (18). A solubilidade na água e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante de Henry, que indica os riscos de perda do produto químico em estudo por evaporação. A realização do ensaio sem as informações acima enumeradas deve ser objeto de uma ponderação cuidadosa, uma vez que a conceção do estudo dependerá das propriedades físico-químicas do produto químico em causa e que, sem estes dados, os resultados do ensaio podem ser difíceis de interpretar ou desprovidos de sentido. Para determinar a concentração do produto nas soluções de ensaio, deve dispor-se de um método de análise fiável, com uma previsão e um limite de deteção conhecidos e notificados. Os produtos químicos em estudo solúveis em água podem ser dissolvidos em alíquotas de água de diluição a uma concentração que permita alcançar a concentração de ensaio-alvo num sistema de fluxo contínuo. Os produtos químicos líquidos ou sólidos à temperatura ambiente e moderadamente solúveis na água podem necessitar de saturadores líquido:líquido ou líquido:sólido (por exemplo, coluna de lã de vidro) (19). Embora também seja possível administrar produtos químicos muito hidrófobos através da alimentação, esta via de exposição foi pouco explorada no presente ensaio.
21. As soluções de ensaio são ajustadas à concentração pretendida por diluição de uma solução-mãe. De preferência, a solução-mãe deve ser preparada por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição, por meios mecânicos (agitação e/ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas/sistemas de saturação ou métodos de dosagem passiva (20) para obter uma solução-mãe com a concentração pretendida. São preferíveis os sistemas desprovidos de veículos; no entanto, os diferentes produtos químicos em estudo devem possuir propriedades físico-químicas variadas, que irão provavelmente exigir abordagens diferentes para a preparação das soluções aquosas para exposição química. Devem ser evitados todos os esforços para evitar a utilização de solventes ou outros veículos, porque: 1) alguns solventes podem, por si mesmos, provocar toxicidade e/ou respostas indesejáveis ou inesperadas; 2) o ensaio de produtos químicos acima da sua solubilidade em água (passível de ocorrer frequentemente quando se utilizam solventes) pode resultar em determinações inexatas de concentrações efetivas; 3) a utilização de solventes pode resultar num grau significativo de formação de biofilmes decorrente da atividade microbiana, com possível impacto nas condições ambientais, bem como na capacidade de manter as concentrações de exposição; 4) na ausência de dados históricos que demonstrem que o solvente não influencia o resultado do estudo, a sua utilização exige um tratamento compatível com o bem-estar animal, uma vez que é necessário um número superior de animais para a realização do ensaio. Para os produtos químicos difíceis de ensaiar, é possível, em último recurso, utilizar um solvente – consultar o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade aquática de substâncias e misturas difíceis (21) para estabelecer o melhor método. A escolha do solvente será determinada pelas propriedades químicas do produto químico em estudo e pela existência de dados de controlos históricos sobre o solvente. Na ausência destes, é necessário determinar a pertinência do solvente antes da realização do estudo definitivo. Caso seja inevitável a utilização de um solvente e ocorra atividade microbiana (formação de biofilmes), recomenda-se o registo/a inclusão no relatório da presença de biofilme em cada cuba (pelo menos uma vez por semana) durante todo o ensaio. Idealmente, a concentração de solvente deve ser mantida constante no controlo com solvente e em todos os grupos de tratamento. Caso tal não suceda, deve-se utilizar no controlo com solvente a concentração mais elevada no tratamento de ensaio. Se o solvente for utilizado como veículo, as suas concentrações máximas não devem exceder 100 µl/l ou 100 mg/l (21), recomendando-se que se mantenha a concentração mais baixa possível (por exemplo, ≤ 20 µl/l), para evitar que o solvente influencie os parâmetros medidos (22).

Animais de ensaio

Espécie de ensaio

22. A espécie utilizada no ensaio é *X. laevis*, porque se trata de uma espécie: 1) criada por rotina em laboratórios de todo o mundo, 2) facilmente obtida no comércio; 3) cujo sexo genético pode ser determinado.

Cuidados e reprodução de adultos

23. Os métodos de cuidados e de reprodução adaptados a *X. laevis* são descritos num documento de orientação normalizada (23). As condições de alojamento e os cuidados a ter com *X. laevis* também são descritos por Read (24). Para induzir a reprodução, três a cinco pares de adultos machos e fêmeas recebem uma injeção intraperitoneal de gonadotropina coriônica humana (hCG). A dose injetada nas fêmeas e nos machos é de, aproximadamente, 800-1000 UI e 500-800 UI, respetivamente, de hCG dissolvida numa solução salina a 0,6-0,9 % (ou uma solução de

Ringer isotónica salina, aplicável aos anfíbios). Os volumes injetados devem ser equivalentes a cerca de 10 µl/g de peso corporal (~1 000 µl). Em seguida, mantêm-se os casais reprodutores induzidos em grandes viveiros, ao abrigo de perturbações e em condições estáticas, de modo a estimular o amplexo. Cada viveiro de reprodução deve estar equipado com um fundo falso composto por uma rede em aço inoxidável (por exemplo, aberturas de 1,25 cm), para que os ovos possam cair para o fundo. As rãs injetadas com hCG no final da tarde põem normalmente a maior parte dos seus ovos até ao meio da manhã seguinte. Após a libertação e a fecundação de uma quantidade suficiente de ovos, os adultos devem ser retirados dos viveiros de reprodução. Os ovos são, em seguida, recolhidos e os revestimentos gelatinosos são removidos por tratamento com L-cisteína (23). Prepara-se uma solução de L-cisteína a 2 % e o pH é ajustado para 8,1 com NaOH 1 M. Esta solução a 21 °C é adicionada a um erlenmeyer de 500 ml que contenha os ovos de uma única desova, agitada cuidadosamente durante um a dois minutos e depois bem enxaguada, 6 a 8 vezes, com água de cultura a 21 °C. Os ovos são depois transferidos para um cristalizador e a sua viabilidade é determinada, devendo ser > 70 %, com anomalias mínimas nos embriões que apresentem divisão celular.

CONCEÇÃO DO ENSAIO

Concentrações de ensaio

24. Recomenda-se a utilização de, no mínimo, quatro concentrações do produto químico em estudo e de controlos adequados (incluindo controlos com solvente, se necessário). Regra geral, recomenda-se a separação das concentrações por um fator de espaçamento não superior a 3,2.
25. Para efeitos do presente ensaio, devem utilizar-se, na medida do possível, os resultados dos estudos existentes sobre os anfíbios para determinar a concentração mais elevada de ensaio, a fim de evitar concentrações manifestamente tóxicas. Podem contribuir para a definição desta concentração informações provenientes, por exemplo, de relações estrutura-atividade quantitativas, de referências cruzadas e de dados de estudos sobre anfíbios, como o ensaio da metamorfose dos anfíbios, o método de ensaio C.38 (25) e o *Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus* (23) e/ou ensaios em peixes, como os métodos de ensaio C.48, C.41 e C.49 (26) (27) (28). Antes da execução do LAGDA, pode realizar-se uma experiência de determinação do intervalo das concentrações. Recomenda-se começar esta experiência nas 24 horas que se seguem à fecundação e manter a exposição durante 7-14 dias (ou mais, se necessário), fixando as concentrações de ensaio de modo a que sejam espaçadas por um fator de 10. Os resultados da experiência de determinação do intervalo das concentrações devem servir para estabelecer a concentração de ensaio máxima no LAGDA. Note-se que, se for necessário utilizar um solvente, a respetiva pertinência (ou seja, a questão de saber se pode influenciar o resultado do estudo) pode ser avaliada no âmbito do estudo de determinação do intervalo de concentrações.

Replicados no âmbito dos grupos de tratamento e dos controlos

26. Deve usar-se um mínimo de quatro viveiros replicados por concentração de ensaio e um mínimo de oito replicados para os controlos (e para o controlo com solvente, se necessário), pelo que o número de replicados no controlo e o eventual controlo com solvente deve ser duas vezes superior ao número de replicados de cada grupo de tratamento, a fim de garantir uma representatividade estatística adequada). Cada replicado deve conter, no máximo, 20 animais. O número mínimo de animais tratados seria de 15 (5 para a subamostra na fase NF62 e 10 juvenis). No entanto, são adicionados animais suplementares a cada replicado, a fim de manter o número crítico de 15 em caso de mortalidade.

PROCEDIMENTO

Síntese do ensaio

27. O ensaio é iniciado com embriões recém-eclodidos (fase NF8-10) e continua até ao desenvolvimento dos juvenis. Os animais são examinados diariamente para detetar mortalidade e quaisquer sinais de comportamento anormal. Na fase NF62, é recolhida uma subamostra de larvas (até 5 animais por replicado) e são examinados vários parâmetros (quadro 1). Depois de todos os animais terem atingido a fase NF66, ou seja, a conclusão da metamorfose (ou após 70 dias a contar do início do ensaio, consoante o que ocorrer primeiro), é efetuada uma seleção aleatória – mas sem subamostragem –, a fim de reduzir o número de animais a 10 por tanque (ver ponto 43); os restantes animais continuam a ser expostos até 10 semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 no controlo. No final do ensaio (amostragem juvenil) são efetuadas medições complementares (quadro 1).

Condições de exposição

28. O apêndice 3 contém um resumo completo dos parâmetros de ensaio. Durante o período de exposição, deve medir-se diariamente o oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH das soluções de ensaio. A condutividade, a alcalinidade e a dureza são medidas uma vez por mês. No que diz respeito à temperatura da água das soluções de ensaio, os diferenciais entre replicados e entre tratamentos (no espaço de um dia) não devem exceder 1,0 °C. Além disso, no que se refere ao pH das soluções de ensaio, os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5.
29. As cubas de exposição podem ser sifonadas diariamente para remover os alimentos não consumidos e os produtos residuais, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada das cubas. Convém procurar minimizar a tensão e o trauma dos animais, sobretudo durante as deslocações, a limpeza dos aquários e o manuseamento. Há que evitar situações e ações que possam gerar tensão, como ruídos fortes e/ou continuados, batimentos nos aquários ou vibrações nas cubas.

Duração da exposição ao produto químico em estudo

30. A exposição é iniciada com embriões recém-eclodidos (fase FN8-10) e prolonga-se até dez semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 (≤ 45 dias a contar do início do ensaio) no grupo de controlo. Regra geral, a duração do LAGDA é de 16 semanas (máximo de 17 semanas).

Início do ensaio

31. Os animais progenitores utilizados para o início do ensaio devem ter previamente demonstrado que produzem descendência que pode ser geneticamente sexuada (apêndice 5). Após a desova dos adultos, os embriões são recolhidos, tratados com cisteína para remover o revestimento gelatinoso e selecionados em função da sua viabilidade (23). O tratamento com cisteína permite que os embriões sejam manuseados durante a seleção sem que adiram às superfícies. Esta é efetuada com o auxílio de um microscópio de dissecação, utilizando um conta-gotas de tamanho adequado para eliminar os embriões não viáveis. É preferível utilizar para o ensaio uma única desova que assegure uma viabilidade superior a 70 %. Os embriões na fase NF8-10 são distribuídos aleatoriamente por cubas de tratamento com um volume adequado de água de diluição, até que cada cuba contenha 20 embriões. Importa manusear os embriões com cuidado durante esta transferência, a fim de minimizar a tensão associada à manipulação e de evitar causar-lhes alguma lesão. Noventa e seis horas após a fecundação, os girinos devem ter subido ao longo da coluna de água e começado a agarrar-se às paredes da cuba.

Regime alimentar

32. O regime e a frequência de alimentação evoluem em função das fases de desenvolvimento de *X. laevis* e representam um aspeto muito importante do protocolo LAGDA. O excesso de alimentação durante a fase larvar conduz geralmente ao aumento da incidência e da gravidade da escoliose (apêndice 8), devendo ser evitado. Em contrapartida, a alimentação insuficiente durante a fase larvar resulta em taxas de desenvolvimento altamente variáveis entre os controlos, o que pode comprometer a representatividade estatística ou provocar confusão nos resultados dos ensaios. O apêndice 4 apresenta o regime alimentar recomendado para as larvas e os juvenis de *X. laevis* em condições de ensaio com fluxo contínuo, embora sejam admissíveis alternativas, desde que os organismos de ensaio cresçam e se desenvolvam de forma satisfatória. É importante notar que, caso estejam a ser medidos os parâmetros específicos do sistema endócrino, os alimentos devem ser isentos de substâncias ativas neste sistema, como a farinha de soja.

Alimentação das larvas

33. O regime alimentar recomendado para as larvas consiste em alimento inicial para trutas, discos de *Spirulina* e flocos para peixe-dourado (por exemplo, flocos TetraFin[®], Tetra, Alemanha), misturados na água de cultura ou de diluição. Esta mistura é administrada três vezes por dia, nos dias úteis, e uma vez por dia, aos fins de semana. Os girinos são igualmente alimentados com náuplios de 24 horas de artémias vivas (*Artemia* spp.), duas vezes por dia, nos dias úteis, e uma vez por dia, aos fins de semana, a começar no dia 8 após a fecundação. A alimentação das larvas, que deve ser homogénea em cada cuba de ensaio, deve permitir o crescimento e o desenvolvimento adequados dos animais, a fim de assegurar a reprodutibilidade e a transferibilidade dos resultados do ensaio: 1) o tempo mediano até à fase NF62 nos controlos deve ser ≤ 45 dias; 2) recomenda-se um peso médio de $1,0 \pm 0,2$ g na fase NF62 nos controlos.

Alimentação dos juvenis

34. Uma vez concluída a metamorfose, o regime de alimentação é constituído por alimentos de primeira escolha para anfíbios, por exemplo Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, EUA) (apêndice 4). Para as jovens rãs (juvenis precoces), os granulados são triturados brevemente num moinho de café ou numa misturadora ou esmagados com almofariz e pilão, a fim de reduzir a sua dimensão. Quando os juvenis forem suficientemente grandes para consumir os granulados inteiros, deixa de ser necessário triturá-los ou esmagá-los. Os animais devem ser alimentados uma vez por dia. A alimentação dos juvenis deve permitir o crescimento e o desenvolvimento adequados dos organismos: recomenda-se um peso médio de $11,5 \pm 3$ g nos juvenis de controlo no final do ensaio.

Química analítica

35. Antes do início do ensaio, há que definir a estabilidade do produto químico em estudo (*por exemplo*, a solubilidade, a degradabilidade e a volatilidade) e todos os métodos analíticos necessários, *por exemplo* com base em informações ou conhecimentos existentes. Em caso de administração das doses através da água de diluição, recomenda-se a análise das soluções de cada cuba replicada antes do início do ensaio, para verificar o desempenho do sistema. Durante o período de exposição, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos adequados, de preferência uma vez por semana em, pelo menos, um replicado para cada grupo de tratamento, mudando todas as semanas de replicado num mesmo grupo de tratamento. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. Todavia, se a concentração do produto químico testado em solução tiver sido corretamente mantida, durante todo o ensaio, num intervalo de ± 20 % em relação à concentração nominal, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos. Além disso, o coeficiente de variação (CV) das concentrações de ensaio medidas ao longo de todo o período de ensaio num tratamento deve ser mantido, no máximo, a 20 % em cada concentração. Se as concentrações medidas não permanecerem no intervalo de 80-120 % da concentração nominal (*por exemplo*, ao testar produtos químicos altamente biodegradáveis ou adsorventes), as concentrações com efeito devem ser determinadas e expressas em relação à média aritmética das concentrações dos ensaios de fluxo contínuo.
36. Os débitos da água de diluição e da solução-mãe devem ser verificados a intervalos adequados – *por exemplo*, três vezes por semana – durante o período de exposição. No caso de produtos químicos que não possam ser detetados em algumas ou todas as concentrações nominais (*por exemplo*, devido a degradação rápida ou adsorção nas cubas de ensaio, ou a uma acumulação significativa no organismo dos animais expostos), recomenda-se que a taxa de renovação da solução de ensaio em cada cuba seja adaptada de modo a manter as concentrações de ensaio tão constantes quanto possível.

Observações e parâmetros medidos

37. Os parâmetros avaliados durante a exposição correspondem aos indicadores de toxicidade, incluindo mortalidade, comportamento anormal, sinais clínicos de doença e/ou de toxicidade geral e determinantes do crescimento (comprimento e peso), bem como aos parâmetros patológicos que possam corresponder, quer à toxicidade geral, quer aos mecanismos de ação dos perturbadores endócrinos que agem em processos fisiológicos mediados por estrogénios, por androgénios ou pela tiroide. Além disso, a concentração plasmática de VTG pode ser medida, a título facultativo, no final do ensaio. Esta medição pode ser útil para interpretar os resultados do estudo no contexto dos mecanismos endócrinos dos produtos químicos suspeitos de serem desreguladores endócrinos. Os parâmetros e o calendário das medições encontram-se resumidos no quadro 1.

Quadro 1
Síntese dos parâmetros do LAGDA

Parâmetros (*)	Diariamente	Amostragem intercalar (amostras larvares)	Fim do ensaio (amostras de juvenis)
Mortalidade e anomalias	X		
Tempo até à fase NF62		X	
Histo(pato)logia (glândula tiroide)		X	
Morfometria (aumento do peso e do comprimento)		X	X
Índice hepatossomático (IHS)			X
Rácios sexuais genéticos/fenotípicos			X
Histopatologia (gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado)			X
Vitelogenina (VTG) (facultativo)			X

(*) Todos os parâmetros são analisados em termos estatísticos.

Mortalidade e observações diárias

38. Todos os viveiros devem ser verificados diariamente para detetar animais mortos, devendo registar-se a mortalidade em cada viveiro. Os animais mortos devem ser retirados do viveiro logo que sejam detetados. Deve registar-se do seguinte modo a fase de desenvolvimento dos animais mortos: anterior à fase NF58 (antes da aparição dos membros anteriores), entre as fases NF58 e NF62, entre as fases NF63 e NF66 (entre a fase NF62 e a absorção total da cauda) e posterior à fase NF66 (pós-larvar). Taxas de mortalidade superiores a 20 % podem indicar condições de ensaio inadequadas ou efeitos manifestamente tóxicos do produto químico em estudo. Os animais tendem a ser mais sensíveis a episódios de mortalidade não induzida por produtos químicos durante os primeiros dias de desenvolvimento após a desova e durante o clímax metamórfico. Esta mortalidade pode ser visível a partir dos dados de controlo.
39. Além disso, deve registar-se qualquer comportamento anormal observado, bem como malformações visíveis (por exemplo, escoliose) ou lesões. As observações de escoliose devem ser contadas (determinação da incidência) e classificadas quanto à gravidade (por exemplo, não observada – NO, mínima – 1, moderada – 2, grave – 3; apêndice 8). Devem envidar-se esforços para limitar a prevalência de escoliose moderada e grave (inferior a 10 % nos controlos) ao longo de todo o estudo, embora uma maior prevalência de anomalias no controlo não constitua necessariamente um motivo para interromper o ensaio. O comportamento normal dos animais em fase larvar caracteriza-se pela suspensão na coluna de água com a cauda a um nível superior à cabeça, pelo batimento rítmico regular da barbatana caudal, por emersões periódicas, pelos movimentos dos opérculos e pela reação a estímulos. Constituem comportamentos anormais, por exemplo, a flutuação à superfície, a imobilização no fundo do viveiro, a natação invertida ou irregular, a falta de atividade à superfície e a ausência de reação aos estímulos. Para os animais pós-metamórficos, além dos comportamentos anormais acima referidos, devem registar-se diferenças notórias no consumo de alimentos entre os grupos tratados. Entre as lesões e malformações visíveis podem incluir-se anomalias morfológicas (por exemplo, deformações dos membros), lesões hemorrágicas, edema abdominal e infeções bacterianas ou fúngicas, entre outras. O surgimento de lesões na cabeça dos juvenis, logo atrás das narinas, pode indicar níveis de humidade insuficientes. Estas determinações são de ordem qualitativa e são consideradas análogas aos sinais clínicos de doença/stress, sendo efetuadas em comparação com os animais de controlo. Uma taxa de ocorrência nos viveiros superior à dos controlos constitui prova de toxicidade manifesta.

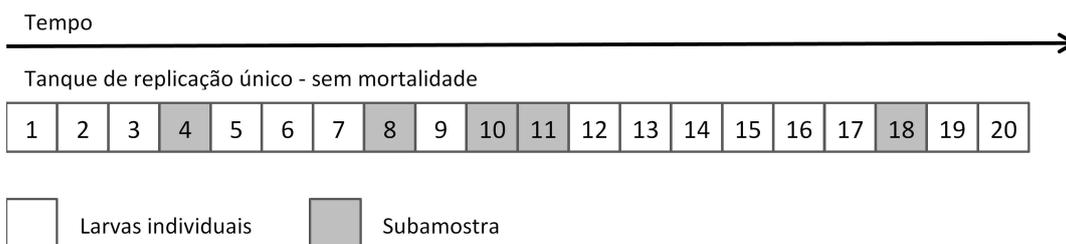
Subamostras de larvas

Descrição geral da preparação de subamostras de larvas:

40. Os girinos que tenham atingido a fase NF62 devem ser retirados dos viveiros e colhidos para amostragem ou transferidos para um novo viveiro para a parte seguinte da exposição, ou separados fisicamente dos restantes girinos no mesmo viveiro com um divisor. Os girinos são verificados diariamente, registando-se os dias do estudo em que cada girino atinge a fase NF62. A característica determinante no âmbito desta avaliação é a forma da cabeça. No momento em que o tamanho da cabeça diminui ao ponto de parecer ter sensivelmente a mesma largura que o tronco do girino e em que os membros anteriores atingem o nível do meio do coração, o indivíduo é registado como tendo atingido a fase NF62.
41. O objetivo é recolher amostras de um número total de cinco girinos na fase NF62 por cuba replicada. Este procedimento deve ser realizado de forma totalmente aleatória, mas decidida *a priori*. A **figura 1** apresenta um exemplo hipotético de uma cuba replicada. Caso existam 20 girinos sobreviventes num viveiro específico quando o primeiro indivíduo atinge a fase NF62, devem ser escolhidos ao acaso cinco números de 1 a 20. O girino n.º 1 é o primeiro indivíduo a atingir a fase NF62 e o girino n.º 20 é o último indivíduo do viveiro a atingir a fase NF62. Do mesmo modo, se houver 18 larvas sobreviventes num viveiro, devem ser escolhidos cinco números ao acaso de 1 a 18. Segue-se o mesmo procedimento para cada cuba replicada assim que o primeiro indivíduo do ensaio atinge a fase NF62. Caso sejam detetados animais mortos durante a fase NF62 da amostragem, as restantes amostras têm de ser novamente selecionadas aleatoriamente, com base no número de larvas remanescentes abaixo da fase NF62 e no número de amostras adicionais necessárias para atingir um total de cinco amostras a partir desse replicado. No dia em que um girino atinge a fase NF62, consulta-se o diagrama de amostragem elaborado para determinar se o indivíduo em causa deve ser colhido para amostragem ou separado fisicamente dos restantes girinos para continuar a ser exposto. No exemplo apresentado (figura 1), o primeiro indivíduo a atingir a fase NF62 (caixa n.º 1) é separado fisicamente das outras larvas, continua a ser exposto e regista-se o dia do estudo em que tenha atingido a fase NF62. Subsequentemente, os indivíduos n.º 2 e n.º 3 são tratados da mesma forma que o n.º 1; em seguida, o indivíduo n.º 4 é colhido para amostra, para observação do crescimento e histologia da tiroide (neste exemplo). Este procedimento continua até que o 20.º indivíduo se junte aos restantes indivíduos que passaram a fase NF62 ou seja incluído na amostra. O procedimento aleatório utilizado deve permitir que cada indivíduo tenha a mesma probabilidade de ser selecionado. Para isso, é válido qualquer método de escolha aleatória, embora seja necessário garantir que todos os girinos são contabilizados a um dado momento durante o período de subamostragem, antes de alcançarem a fase NF62.

Figura 1

Exemplo hipotético do regime de amostragem na fase NF62 para uma única cuba replicada



42. No caso da subamostragem das larvas, os parâmetros obtidos são os seguintes: 1) tempo decorrido até à fase NF62 (número de dias entre a fecundação e a fase NF62); 2) anomalias externas; 3) morfometria (por exemplo, peso e comprimento); 4) histologia da tiroide.

Eutanásia dos girinos

43. A subamostra de girinos na fase NF62 (cinco indivíduos por replicado) deve ser eutanasiada por imersão, durante 30 minutos, em quantidades adequadas (por exemplo, 500 ml) de solução anestésica (por exemplo, solução a 0,3 % de MS-222, metanossulfonato de triclaína, n.º CAS 886-86-2). A solução de MS-222 deve ser tamponada com bicarbonato de sódio até atingir um pH de cerca de 7,0, uma vez que uma solução MS-222 não tamponada é ácida e irritante para a pele da rã, resultando numa absorção deficiente e em tensão adicional desnecessária para os animais.
44. Os girinos são retirados da cuba experimental utilizando um enxalavar e transportados para a solução de eutanásia, onde são colocados. O animal é devidamente eutanasiado, estando preparado para a autópsia quando deixa de responder a estímulos externos como o beliscar do membro posterior com um par de fórceps.

Morfometria (peso e comprimento)

45. As medições do peso húmido (arredondada para o mg mais próximo) e do comprimento do focinho à cloaca (CFC) (arredondada para o 0,1 mm mais próximo) de cada girino devem ser efetuadas imediatamente depois de deixar de responder aos estímulos sob o efeito da anestesia (figura 2a). Pode utilizar-se *software* de análise de imagem para medir o CFC a partir de uma fotografia. Os girinos devem ser secados por tamponagem antes de serem pesados, de modo a remover o excesso de água aderente. Após as medições da dimensão corporal (peso e CFC), devem registar-se ou anotar-se quaisquer anomalias morfológicas visíveis e/ou sinais clínicos de toxicidade, tais como escoliose (ver apêndice 8), petéquias e hemorragia, sendo recomendável a utilização de documentação digital. De notar que as petéquias são pequenas hemorragias de cor vermelha ou púrpura nos capilares subcutâneos.

Colheita e fixação de tecidos

46. As glândulas tiroides da subamostra de larvas são submetidas a uma avaliação histológica. A parte inferior do tronco posterior aos membros anteriores é removida e rejeitada. A carcaça cortada é fixada em fixador de Davidson. O volume de fixador no recipiente deve ser, no mínimo, 10 vezes o volume aproximado dos tecidos. O fixador deve ser agitado ou circulado de forma adequada, para fixar corretamente os tecidos a analisar. Todos os tecidos permanecem no fixador de Davidson durante, pelo menos, 48 horas, mas não mais de 96 horas, altura em que são enxaguados com água desionizada e armazenados em formol neutro tamponado a 10 % (1) (29).

Histologia da tireoide

47. Cada subamostra de larvas (tecidos fixados) é submetida a uma avaliação histológica da glândula tireoide, nomeadamente diagnóstico e classificação da gravidade (29) (30).

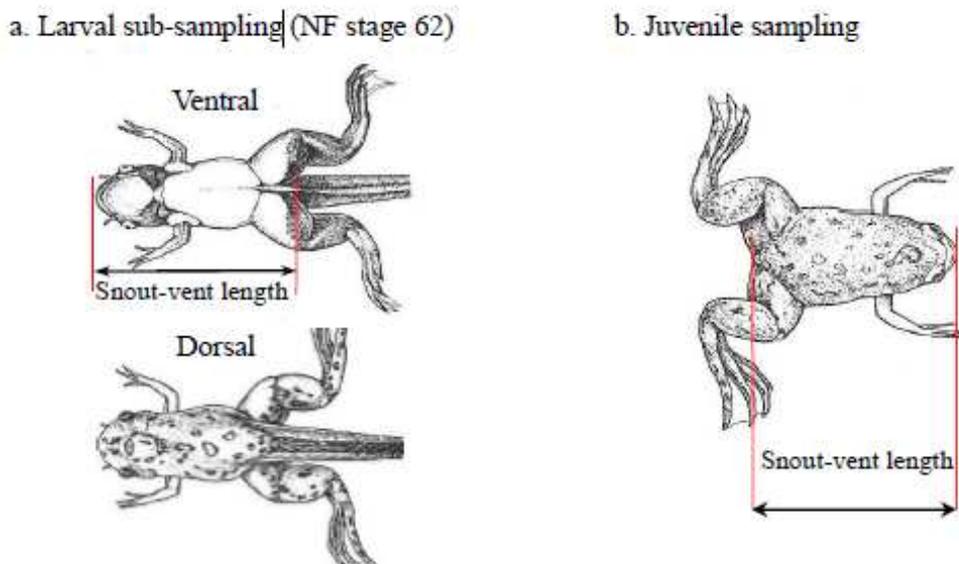


Figura 2: Referências para a medição do comprimento do focinho à cloaca para o LAGDA nas rãs em fase NF62 (a) e juvenis (b). Características que definem a fase NF62 (a): a cabeça tem a mesma largura que o tronco, o comprimento do nervo olfativo é inferior ao diâmetro do bulbo olfativo (vista dorsal) e os membros anteriores estão ao nível do coração (vista ventral). Imagens adaptadas de Nieuwkoop e Faber (1994).

Fim da exposição larvar

48. Tendo em conta o número inicial de girinos, é provável que uma pequena percentagem de indivíduos não se desenvolva normalmente e não complete a metamorfose (fase NF66) num período razoável. A parte larvar da exposição não deve exceder 70 dias. Os girinos restantes no final deste período devem ser eutanasiados (ver ponto 43), o seu peso húmido e CFC medidos, a sua fase de desenvolvimento determinada segundo Nieuwkoop e Faber (1994) e quaisquer anomalias de desenvolvimento anotadas.

Seleção após a fase NF66

49. Devem permanecer dez indivíduos por viveiro a partir da fase NF66 (reabsorção completa da cauda), até ao final da exposição. Por conseguinte, há que efetuar uma seleção após todos os animais terem atingido a fase NF66 ou após 70 dias (consoante o que ocorrer primeiro). Os animais que tenham atingido a fase NF66 mas que não serão expostos até ao final da exposição devem ser selecionados aleatoriamente.
50. Os animais não selecionados para serem conservados até ao fim da exposição são eutanasiados (ver ponto 43). Determina-se a fase de desenvolvimento, o peso húmido e o CFC (figura 2b) e é efetuada uma autópsia macroscópica de cada animal. Regista-se o sexo fenotípico (com base na morfologia das gónadas) – feminino, masculino ou indeterminado.

Amostras de juvenis

Descrição geral da preparação de amostras de juvenis

51. Os restantes animais continuam a ser expostos até 10 semanas após o tempo médio que decorre até à fase NF62 no controlo com água de diluição (e/ou no controlo com solvente, se for caso disso). No final do período de exposição, os restantes animais (no máximo, 10 rãs por replicado) são eutanasiados e os vários parâmetros medidos, ou avaliados, e registados: 1) morfometria (peso e comprimento); 2) rácios sexuais fenotípicos/genotípicos; 3) peso hepático (índice hepatossomático); 4) histopatologia (gónadas, ductos reprodutores, fígado e rins); a título facultativo, 5) VTG plasmática.

Eutanásia das rãs

52. As amostras de juvenis (rãs pós-metamórficas) são eutanasiadas por injeção intraperitoneal de um anestésico, como, por exemplo, MS-222 a 10 % numa solução-tampão de fosfatos adequada. As rãs podem ser incluídas na amostra depois de deixarem de responder a estímulos (em geral cerca de 2 minutos após a injeção, se for utilizado MS-222 a 10 % numa dosagem de 0,01 ml por g de rã). Embora as rãs juvenis possam ser imersas num anestésico mais concentrado (MS-222), a experiência demonstrou que uma anestesia segundo este método é mais demorada e que esta duração poderá não ser adequada para a amostragem. A injeção permite uma eutanásia rápida e eficiente antes da amostragem. A amostragem não deve ser iniciada antes de se confirmar a ausência de resposta das rãs a estímulos, para garantir que os animais estão mortos. Se as rãs apresentarem sinais de sofrimento considerável (muito graves, com morte previsível) e se considerar estarem moribundas, devem ser anestesiadas e eutanasiadas, sendo incluídas no parâmetro «mortalidade» para efeitos de análise de dados. Quando uma rã é eutanasiada devido a morbilidade, este facto deve ser registado e notificado. Consoante o momento do estudo em que a rã é eutanasiada, pode ser conservada e fixada para análise histopatológica.

Morfometria (peso e comprimento)

53. As medições do peso húmido e do CFC (figura 2b) são idênticas às descritas para as subamostras de larvas.

VTG plasmática (opção)

54. A VTG é um biomarcador amplamente aceite, resultante da exposição a produtos químicos estrogénicos. No que respeita ao LAGDA, a VTG plasmática pode, a título facultativo, ser medida em amostras de juvenis, o que pode ser particularmente útil se se suspeitar que o produto químico em estudo é um estrogénio.
55. Os membros posteriores dos juvenis eutanasiados são cortados e o sangue recolhido com um tubo capilar heparinizado (embora possam revelar-se adequados métodos alternativos de colheita de sangue, como a punção cardíaca). O sangue é expelido para um tubo de microcentrífuga (por exemplo, de 1,5 ml) e centrifugado para obter plasma. As amostras de plasma devem ser armazenadas a uma temperatura igual ou inferior a -70 °C até à determinação da VTG. A concentração de VTG plasmática pode ser determinada por um ensaio de imunoabsorção enzimática (método ELISA – apêndice 6) ou por um método alternativo, como a espectrometria de massa (31). É preferível utilizar anticorpos específicos da espécie, devido à sua maior sensibilidade.

Determinação do sexo genético

56. O sexo genético de cada rã juvenil é avaliado com base nos marcadores desenvolvidos por Yoshimoto *et al.* (11). Para determinar o sexo genético, uma parte (ou a totalidade) de um membro posterior – ou de qualquer outro tecido – removido durante a dissecação é recolhida e armazenada num tubo de microcentrifuga; podem obter-se amostras de tecido de rãs a partir de qualquer tecido. Os tecidos podem ser armazenados a uma temperatura igual ou inferior a -20 °C até ao isolamento do ácido desoxirribonucleico (ADN). O isolamento do ADN a partir dos tecidos pode ser efetuado com kits disponíveis no mercado e a análise da presença ou ausência do marcador é efetuada por um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) (apêndice 5). Regra geral, a concordância entre o sexo histológico e o genótipo dos animais de controlo no momento da amostragem dos juvenis nos grupos de controlo é superior a 95 %.

Colheita e fixação de tecidos para histopatologia

57. As gónadas, os ductos reprodutores, os rins e os fígados são colhidos para análise histológica durante a amostragem final. A cavidade abdominal é aberta e o fígado é dissecado e pesado. Em seguida, os órgãos digestivos (estômago, intestinos, etc.) são cuidadosamente retirados do abdómen inferior para revelar as gónadas, os rins e os ductos reprodutores. Devem anotar-se quaisquer anomalias morfológicas visíveis nas gónadas. Por último, os membros posteriores devem ser removidos se não tiverem sido previamente retirados para colheita de sangue. Os fígados colhidos e a carcaça com as gónadas deixadas *in situ* devem ser imediatamente colocados em fixador de Davidson. O volume de fixador no recipiente deve ser, no mínimo, 10 vezes o volume aproximado dos tecidos. Todos os tecidos permanecem no fixador de Davidson durante, pelo menos, 48 horas, mas não mais de 96 horas, altura em que são enxaguados com água desionizada e armazenados em formol neutro tamponado a 10 % (1) (29).

Histopatologia

58. Cada amostra de juvenis é submetida a uma análise histológica para detetar uma eventual patologia nas gónadas, nos ductos reprodutores, nos rins e nos tecidos hepáticos, para diagnóstico e classificação de gravidade (32). O fenótipo gonadal (ovários, testículos, intersexual) decorre também desta avaliação. Juntamente com as medições do sexo genético de cada indivíduo, estas observações podem ser utilizadas para calcular os rácios sexuais fenotípicos/genotípicos.

DADOS E RELATÓRIO

Análise estatística

59. O LAGDA gera três tipos de dados a analisar estatisticamente: 1) dados quantitativos contínuos (peso, CFC, IHS, VTG); 2) dados relativos ao tempo até ao evento, no que se refere às taxas de desenvolvimento (número de dias desde o início do ensaio até à fase NF62); 3) dados ordinais sob a forma de índices de gravidade ou fases de desenvolvimento a partir de avaliações histopatológicas.
60. Recomenda-se que a conceção do ensaio e a seleção dos testes estatísticos assegurem a representatividade necessária para detetar alterações de importância biológica nos parâmetros, sempre que se deva comunicar uma NOEC ou CEX. É preferível efetuar estas análises estatísticas (em geral, com base na média dos replicados) segundo os procedimentos descritos no documento da OCDE sobre os métodos atuais de análise estatística dos dados de ecotoxicidade (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (33). O apêndice 7 apresenta a árvore de decisão recomendada para a análise estatística e fornece orientações para o tratamento dos dados e para a escolha do teste, ou modelo estatístico, mais adequado a utilizar no LAGDA.
61. Os dados das amostras de juvenis (crescimento, IHS, etc.) devem ser analisados separadamente para cada sexo genotípico, uma vez que este é determinado para todas as rãs.

Considerações relativas à análise dos dados

Utilização de replicados e de tratamentos comprometidos

62. Os replicados e os tratamentos podem ser comprometidos devido a uma mortalidade excessiva resultante de toxicidade manifesta, doença ou erro técnico. Se um tratamento for comprometido devido a doença ou erro técnico, devem estar disponíveis para análise três tratamentos não comprometidos e três replicados não comprometidos. Se ocorrer toxicidade manifesta no(s) tratamento(s) com doses elevadas, é preferível que estejam disponíveis para análise, pelo menos, três níveis de tratamento com três replicados não comprometidos – de acordo com a abordagem da concentração máxima tolerada nas orientações de ensaio da OCDE (34). Além da mortalidade, os sinais de toxicidade manifesta podem incluir efeitos comportamentais (por exemplo, flutuação à superfície, imobilização no fundo do viveiro, natação invertida ou irregular, falta de atividade à superfície), lesões morfológicas (por exemplo, lesões hemorrágicas, edema abdominal) ou inibição de reações normais ao regime alimentar quando em comparação com os animais de controlo, de um ponto de vista qualitativo.

Controlo com solvente

63. No final do ensaio, deve efetuar-se uma avaliação dos efeitos potenciais do solvente (se tiver sido utilizado). Para isso, efetua-se uma comparação estatística dos resultados do grupo de controlo com solvente com os do grupo de controlo com água de diluição. Os parâmetros mais relevantes a considerar nesta análise são os fatores que determinam o crescimento (peso e comprimento), já que podem ser afetados em caso de toxicidade generalizada. Se forem detetadas diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros entre o grupo de controlo com água de diluição e o grupo de controlo com solvente, deve recorrer-se ao parecer de um perito para determinar se a validade do ensaio foi comprometida. Se os dois controlos diferirem, os grupos expostos ao produto químico devem ser comparados com o controlo com solvente, a menos que se saiba que é preferível compará-los com o controlo com água de diluição. Caso não haja diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de controlo, recomenda-se que os grupos expostos ao produto químico em estudo sejam comparados com os dois grupos de controlo em conjunto (controlo com solvente e controlo com água de diluição), exceto se se souber que é preferível compará-los, quer com o grupo de controlo com água de diluição, quer com o grupo de controlo com solvente.

Relatório de ensaio

64. O relatório de ensaio deve incluir os seguintes elementos:

Produto químico em estudo:

— Natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes;

— Substância monocomponente:

aspecto físico, solubilidade na água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

identificação química, como o nome IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, a pureza, a identidade química das impurezas, se necessário e exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for caso disso).

- Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Espécie utilizada no ensaio:

- Nome científico, estirpe, se disponível, origem e método de colheita dos ovos fecundados e posterior manuseamento;
- Incidência de escoliose em controlos históricos no que diz respeito à cultura-mãe utilizada.

Condições de ensaio:

- Fotoperíodo(s);
- Conceção do ensaio (por exemplo, dimensões da câmara, volume de água e material, número de câmaras de ensaio e replicados, número de organismos de ensaio por replicado);
- Método de preparação das soluções-mãe e frequência da renovação (se for utilizado um agente solubilizante, deve indicar-se a sua concentração);
- Método de dosagem do produto químico em estudo (por exemplo, bombas, sistemas de diluição);
- Eficiência de recuperação do método e valores nominais das concentrações de ensaio, limite de quantificação, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e respetivos desvios-padrão; método de obtenção desses desvios e médias, bem como elementos comprovativos de que as medições correspondem às concentrações do produto químico em estudo perfeitamente dissolvido;
- Características da água de diluição: pH, dureza, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), iodo total, carbono orgânico total (idem), sólidos em suspensão (idem), salinidade do meio de ensaio (idem) e quaisquer outras medições efetuadas;

- Valores nominais das concentrações de ensaio, médias dos valores medidos e respetivos desvios-padrão;
- Qualidade da água nos recipientes de ensaio, pH, temperatura (diariamente) e concentração de oxigénio dissolvido;
- Informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo, tipo de alimentos, origem, quantidade distribuída e frequência).

Resultados:

- Provas de que os controlos cumpriram os critérios de validade;
 - Dados relativos ao grupo de controlo (mais o controlo com solvente, se este tiver sido utilizado) e aos grupos tratados: mortalidade e anomalias observadas, tempo decorrido até à fase NF62, avaliação da histologia da tiroide (apenas amostra de larvas), crescimento (peso e comprimento), IHS (apenas amostra de juvenis), rácios sexuais genéticos/fenotípicos (apenas amostra de juvenis), resultados da avaliação histopatológica das gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado (apenas amostra de juvenis) e VTG plasmática (apenas amostra de juvenis, se efetuada);
 - Abordagem para a análise estatística e tratamento de dados (teste ou modelo estatístico utilizado);
 - Concentração sem efeitos observáveis (NOEC) para cada resposta avaliada;
 - Concentração mínima com efeito observável (LOEC) para cada resposta avaliada ($\alpha=0,05$); CEx para cada resposta avaliada, se aplicável, e intervalos de confiança (95 %, por exemplo); gráfico do modelo ajustado utilizado para a calcular a CEx, declive da curva concentração-resposta, fórmula do modelo de regressão e estimativa dos parâmetros do modelo e dos respetivos erros-padrão.
 - Qualquer desvio em relação ao presente método de ensaio e aos critérios de aceitação, bem como considerações relativas ao eventual seguimento a dar aos resultados do ensaio.
65. No que diz respeito aos resultados das medições dos parâmetros, devem apresentar-se os valores médios e os respetivos desvios-padrão (por replicado e por concentração, se possível).
66. Deve calcular-se o tempo médio decorrido até à fase NF62 nos controlos, apresentado como a média das medianas nos replicados e o seu desvio-padrão. Do mesmo modo, para os tratamentos, deve calcular-se uma mediana, apresentada como a média das medianas nos replicados e o seu desvio-padrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, Nova Iorque, NY, EUA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.
- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321-327.

- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Filadélfia, PA, EUA.
- (17) Capítulo C.4 do presente anexo: Ensaio de biodegradabilidade fácil.
- (18) Capítulo C.29 do presente anexo: Biodegradabilidade fácil — CO2 em recipientes estanques (ensaio pela técnica de «headspace»).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593-9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69-92.
- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Filadélfia, PA, EUA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Capítulo C.38 do presente anexo, Ensaio da Metamorfose dos Anfíbios.
- (26) Capítulo C.48 do presente anexo, Ensaio de reprodução a curto prazo em peixes.

-
- (27) Capítulo C.41 do presente anexo, Ensaio de desenvolvimento sexual em peixes.
- (28) Capítulo C.49 do presente anexo, Ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, *Toxicological Pathology* 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Techniques* 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology* 91(3): 197-202.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

CE_x: (Concentração efetiva com x % de efeito) concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente a um grupo de controlo. Por exemplo, a CE₅₀ é a concentração estimada que produz efeitos num parâmetro do ensaio em 50 % de uma população exposta durante um determinado período de exposição.

Concentração mínima com efeito observável (LOEC): A menor concentração de ensaio de um produto químico em estudo para a qual se observa um efeito significativo ($p < 0,05$), comparativamente com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior aos observados com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC). O apêndice 7 fornece orientações nesta matéria.

Concentração letal média (CL₅₀): Concentração de um produto químico em estudo que se estima ser letal para 50 % dos organismos sujeitos ao ensaio durante o ensaio.

Concentração sem efeito observável (NOEC): Concentração de ensaio imediatamente abaixo da LOEC que, comparativamente ao grupo de controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), durante um determinado período de exposição.

dpf: Dias pós-fecundação.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática.

Ensaio de fluxo contínuo: Um ensaio com fluxo contínuo de soluções de ensaio através do sistema de ensaio durante o período de exposição.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Parâmetro apical: Provoca efeitos ao nível da população.

Produto químico: Substância ou mistura.

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

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

VTG: Vitelogenina. É uma fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo, que ocorre normalmente nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

Apêndice 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentração limite
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados totais e dos bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsénico	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

Apêndice 3

CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA O LAGDA

1. Espécie de ensaio	<i>Xenopus laevis</i>
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	A temperatura nominal é de 21 °C. A temperatura média durante o ensaio é de 21 ± 1 °C (os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 1 °C).
4. Qualidade da iluminação	Lâmpadas fluorescentes (largo espectro) 600-2000 lux (lúmenes/m ²) à superfície da água
5. Fotoperíodo	12 h de luz/12 h de escuridão
6. Volume da solução de ensaio e recipiente de ensaio (cuba)	4-10 l (profundidade mínima da água de 10–15 cm) Cuba de vidro ou de aço inoxidável
7. Renovação da solução de ensaio, em volume	Constante, a fim de garantir a estabilidade das condições biológicas e da exposição química (por exemplo, cinco renovações do volume do viveiro por dia)
8. Idade dos organismos de ensaio no início	Fase 8-10 segundo Nieuwkoop e Faber (NF)
9. Número de organismos por replicado	20 animais (embriões)/cuba (replicado) no início da exposição e 10 animais (juvenis)/cuba (replicado) após a fase NF66 e até ao fim da exposição
10. Número de tratamentos	No mínimo, 4 tratamentos com o produto químico em estudo e controlo(s) adequado(s).
11. Número de replicados por tratamento	4 replicados por tratamento com o produto químico em estudo e 8 replicados para o(s) controlo(s)
12. Número de organismos por concentração de ensaio	No mínimo 80 animais por tratamento com o produto químico em estudo e, no mínimo, 160 animais para o(s) controlo(s)
13. Água de diluição	Qualquer água que permita o crescimento e desenvolvimento normais de <i>X. laevis</i> (por exemplo, água de nascente ou água da torneira filtrada com carvão)
14. Arejamento	Não é necessária, mas o arejamento das cubas pode ser necessário se os níveis de oxigénio dissolvido descenderem abaixo dos limites recomendados e se o fluxo da solução de ensaio for maximizado.
15. Oxigénio dissolvido da solução de ensaio	≥ 40 % do valor da saturação no ar ou ≥ 3,5 mg/l

16. pH da solução de ensaio 6,5-8,5 (os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5)
17. Dureza e alcalinidade da solução de ensaio 10-250 mg CaCO₃/l
18. Regime alimentar (Ver apêndice 4)
19. Período de exposição Da fase NF8-10 a dez semanas após o tempo mediado até à fase NF62 no grupo de controlo com água de diluição e/ou solvente (máximo 17 semanas)
20. Parâmetros biológicos Mortalidade (e anomalias observadas), tempo até à fase NF62 (amostra de larvas), avaliação da histologia da tiroide (amostra de larvas), crescimento (peso e comprimento), índice hepatossomático (amostra de juvenis), rácios sexuais genéticos/fenotípicos (amostra de juvenis), histopatologia das gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado (amostra de juvenis) e vitelogenina plasmática (amostra de juvenis, facultativa).
21. Critérios de validade do ensaio O oxigénio dissolvido deve ser > 40 % do valor da saturação no ar; A temperatura média da água deve ser de 21 ± 1 °C e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos devem ser < 1,0 °C; O pH da solução de ensaio deve variar entre 6,5 e 8,5; A mortalidade no controlo deve ser ≤ 20 % em cada replicado e o tempo médio até à fase NF62 no controlo deve ser ≤ 45 dias; o peso médio dos organismos de ensaio na fase NF62 e no fim do ensaio no âmbito dos controlos e dos controlos com solvente (se utilizado) deve atingir, respetivamente, 1,0 ± 0,2 e 11,5 ± 3 g; os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo em solução foram corretamente mantidas num intervalo de ± 20 % em relação à média dos valores medidos.

Apêndice 4

REGIME ALIMENTAR

Note-se que, embora este regime alimentar seja recomendado, são admissíveis alternativas, desde que os organismos de ensaio cresçam e se desenvolvam a um ritmo adequado.

Alimentação das larvas*Preparação dos alimentos a administrar às larvas*

A. 1:1 (v/v) alimento inicial para trutas: algas/TetraFin® (ou equivalente);

1. Alimento inicial para trutas: misturar 50 g de alimento inicial para trutas (grânulos finos ou pó) e 300 ml de água filtrada adequada num misturador a alta velocidade, durante 20 segundos
2. Mistura de algas/TetraFin® (ou equivalente): misturar 12 g de discos de espirulina com 500 ml de água filtrada num misturador a alta velocidade durante 40 segundos, misturar 12 g de Tetrafin® (ou equivalente) com 500 ml de água filtrada e, em seguida, combinar tudo a fim de obter 1 l de 12 g/l de espirulina e 12 g/l de Tetrafin® (ou equivalente)
3. Combinar volumes iguais da mistura de alimento inicial para trutas e da mistura de algas/TetraFin® (ou equivalente)

B. Artémias

Fazer eclodir 15 ml de ovos de artémias em 1 l de água salgada (preparada acrescentando 20 ml de NaCl a 1 l de água desionizada). Após o arejamento durante 24 horas à temperatura ambiente, sob luz constante, colhem-se as artémias. O fim do arejamento permite que as artémias se depositem durante 30 minutos. Os quistos que flutuem à superfície do coletor são retirados e eliminados e as artémias filtradas de forma adequada e mergulhadas em 30 ml de água filtrada.

Protocolo alimentar

O quadro 1 ilustra o tipo e a quantidade de alimentos administrados às larvas durante toda a exposição. Os animais devem ser alimentados três vezes por dia, de segunda a sexta-feira, e uma vez por dia aos fins de semana.

Quadro 1

Regime alimentar das larvas de *X. laevis* em condições de fluxo contínuo

Tempo (*) (pós-fecundação)	Alimento inicial para trutas: algas/TetraFin® (ou equivalente)		Artémias	
	Semana (3 vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)	Semana (duas vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)
Dias 4-14 (semanas 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (do dia 8 ao 15) 1 ml (a partir do dia 16)	0,5 ml (do dia 8 ao 15) 1 ml (a partir do dia 16)
Semana 2	0,67 ml	2,4 ml		
Semana 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Semana 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Tempo (*) (pós-fecundação)	Alimento inicial para trutas: algas/TetraFin® (ou equivalente)		Artémias	
	Semana (3 vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)	Semana (duas vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)
Semana 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Semana 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Semana 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Semanas 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) O dia 0 é definido como o dia da injeção de hCG.

Transição alimentar da fase larvar para a fase juvenil

Assim que completam a metamorfose, as larvas transitam para a fórmula alimentar destinada aos juvenis, que a seguir se especifica. Durante a transição, o regime alimentar das larvas deve ser reduzido à medida que o regime alimentar dos juvenis aumenta. Tal pode ser feito reduzindo as rações administradas às larvas na proporção do aumento das administradas aos juvenis em cada grupo de cinco girinos que ultrapasse a fase NF62 e se aproxime da conclusão da metamorfose na fase NF66.

Alimentação dos juvenis

Regime alimentar dos juvenis

Uma vez concluída a metamorfose (fase 66), o regime alimentar passa para alimentos de primeira escolha para anfíbios de 3/32 polegadas em exclusivo (Xenopus Express™, FL, EUA), ou equivalente.

Preparação de grânulos esmagados para a transição da fase larvar para a fase juvenil

Os granulados são triturados brevemente num moinho de café ou numa misturadora, ou esmagados com almofariz e pilão a fim de reduzir a sua dimensão em aproximadamente 1/3. O processamento excessivo produz pó, sendo, por isso, desaconselhado.

Protocolo alimentar

O **quadro 2** ilustra o tipo e a quantidade de alimentos administrados aos juvenis e aos adultos. Os animais devem ser alimentados uma vez por dia. Note-se que, após a metamorfose, os animais continuam a receber uma porção de artémias até mais de 95 % dos animais completarem a metamorfose.

Os animais não devem ser alimentados no dia da conclusão do ensaio, para que a alimentação não interfira na pesagem.

Quadro 2

Regime alimentar de juvenis de *X. laevis* em condições de fluxo contínuo. Note-se que os animais não metamorfoseados, incluindo aqueles cuja metamorfose foi atrasada pelo tratamento com o produto químico, não podem comer grânulos não esmagados

Tempo (*) (semanas após a data mediana de metamorfose)	Grânulos esmagados (mg por jovem rã)	Grânulos (mg por jovem rã)
Aquando da metamorfose dos animais	25	0
Semanas 0-1	25	28
Semanas 2-3	0	110
Semanas 4-5	0	165
Semanas 6-9	0	220

(*) O primeiro dia da Semana 0 é a data mediana de metamorfose nos animais de controlo.

Apêndice 5

DETERMINAÇÃO DO SEXO GENÉTICO (SEXAGEM GENÉTICA)

O método de sexagem genética de *Xenopus laevis* baseia-se em Yosshimoto *et al.* (2008). Podem obter-se os procedimentos de genotipagem detalhados consultando esta publicação. É possível utilizar métodos alternativos (por exemplo, PCR quantitativa de alto débito), se isso for considerado adequado.

Iniciadores de *X. laevis**Marcador DM-W*

Senso: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Contra-senso: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Controlo positivo

Senso: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Contra-senso: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificação do ADN

Purificar o ADN extraído de tecidos musculares ou cutâneos utilizando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506) – ou um produto similar –, de acordo com as respetivas instruções. O ADN pode ser eluído das colunas de centrifugação utilizando menos tampão para obter amostras mais concentradas, se tal for considerado necessário para a PCR. De notar que o ADN é bastante estável; convém, pois, ter cuidado para evitar contaminações cruzadas que possam conduzir a erros na caracterização dos machos como fêmeas, ou vice-versa.

PCR

O **quadro 1** apresenta um exemplo de protocolo utilizando JumpStart™ Taq da Sigma.

Quadro 1

Exemplo de protocolo utilizando JumpStart™ Taq da Sigma

Mistura principal	1x (µl)	[Final]
Água isenta de nuclease	11	—
Tampão 10X	2,0	—
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (10mM cada)	0,4	200 µM
Marcador para iniciador senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marcador para iniciador contra-senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controlo para iniciador senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controlo para iniciador contra-senso (8 µM)	0,8	0,3 µM

Mistura principal	1x (µl)	[Final]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unidades/µl
Matriz de ADN	1,0	~200 pg/µl

Nota: Ao preparar a mistura principal, preparar uma quantidade superior à desejada para compensar eventuais perdas que possam ocorrer durante a pipetagem (exemplo: utilizar 25x para apenas 24 reações).

Reação

Mistura principal	19,0 µl
Matriz	1,0 µl
Total	20,0 µl

Perfil do termociclador

Passo 1.	94 °C	(1 min)
Passo 2.	94 °C	(30 seg)
Passo 3.	60 °C	(30 seg)
Passo 4.	72 °C	(1 min)
Passo 5.	Ir para o	(35 ciclos)
	passo 2	
Passo 6.	72 °C	(1 min)
Passo 7.	4 °C	(manter)

Os produtos PCR podem ser colocados imediatamente num gel ou conservados a 4 °C.

Elektroforese em gel de agarose (3 %) (protocolo de amostragem)

TAE 50X

Tris	24,2 g
Ácido acético glacial	5,71 ml
Na ₂ (EDTA) 2H ₂ O	3,72 g

Adicionar água até perfazer 100 ml

TAE 1X

H ₂ O	392 ml
TAE 50X	8 ml

3:1 Agarose

3 partes de agarose NuSieve™ GTG™

1 parte de agarose Fisher de baixa eletroendosmose (EEO)

Método

1. Preparar um gel a 3 % acrescentando 1,2 g de mistura de agarose a 43 ml de TAE 1X. Agitar para fragmentar os agregados.
2. Aquecer a mistura de agarose no microondas até estar completamente dissolvida (evitar que ferva até transbordar). Deixar arrefecer ligeiramente.
3. Adicionar 1,0 µl de brometo de etídio (10 mg/ml). Agitar o frasco. Note-se que o brometo de etídio é mutagénico, pelo que, para minimizar os riscos para a saúde dos trabalhadores, devem ser utilizados produtos químicos alternativos, na medida do possível do ponto de vista técnico⁽¹⁾.
4. Verter o gel para um molde, com um pente. Deixar arrefecer completamente.
5. Adicionar o gel ao aparelho. Cobrir o gel com TAE 1X.
6. Adicionar 1 µl de 6x corante de dissociação a cada volume de 10 µl de produto PCR.
7. Transferir as amostras para os poços utilizando uma pipeta.
8. Efetuar a eletroforese a 160 volts constantes durante ~20 minutos.

A **figura 1** apresenta uma imagem do gel de agarose com os padrões de bandas indicativos de um indivíduo macho e de um indivíduo fêmea.

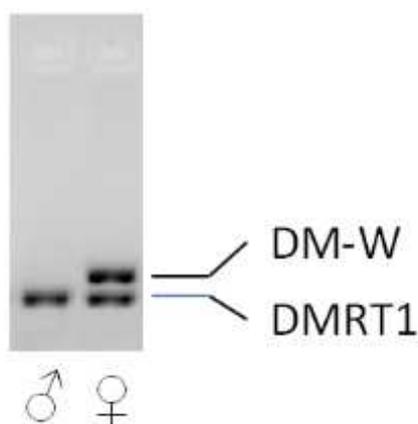


Figura 1 Imagem do gel de agarose com o padrão de banda indicativo de um macho (♂) (banda única a ~203 bp: DMRT1) e de uma fêmea (♀) (duas bandas a ~259 bp: DM-W e 203 bp:DMRT1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

⁽¹⁾ Em conformidade com o artigo 4.º, n.º 1, da Diretiva 2004/37/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativa à proteção dos trabalhadores contra riscos ligados à exposição a agentes cancerígenos ou mutagénicos durante o trabalho (sexta diretiva especial nos termos do n.º 1 do artigo 16.º da Diretiva 89/391/CEE do Conselho) (JO L 158 de 30.4.2004, p. 50).

Apêndice 6

DETERMINAÇÃO DA VITELOGENINA

A determinação da vitelogenina (VTG) efetua-se por recurso a um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), originalmente desenvolvido para a VTG do vairão-de-cabeça-grande (Parks *et al.*, 1999). Atualmente, não existem anticorpos disponíveis no mercado para *X. laevis*. No entanto, dada a grande quantidade de informações relativas a esta proteína e a existência de serviços comerciais de produção de anticorpos com uma boa relação custo-eficácia, é razoável que os laboratórios possam facilmente desenvolver um teste ELISA para efetuar a determinação (Olmstead *et al.*, 2009). Além disso, estes autores apresentam uma descrição do ensaio modificado para a VTG em *X. tropicalis*, conforme se descreve a seguir. O método utiliza um anticorpo produzido contra a VTG de *X. tropicalis*, que se sabe funcionar também para a VTG de *X. laevis*. Note-se que também podem ser utilizados testes ELISA não competitivos, os quais podem ter limites de deteção inferiores ao método que seguidamente se descreve.

Materiais e reagentes

- Soro com o 1.º anticorpo (Ac) pré-adsorvido
- Misturar uma parte de soro contendo o 1.º anticorpo anti-VTG de *X. tropicalis* com duas partes de plasma de macho do grupo de controlo; deixar repousar à temperatura ambiente durante ~ 75 minutos, colocar em gelo durante 30 minutos, centrifugar > 20K x G durante 1 hora a 4 °C, retirar o sobrenadante, dividir em alíquotas e armazenar a -20 °C.
- 2.º anticorpo
- Conjugado IgG de cabra anti-coelho-peroxidase de rábano (HRP) (por exemplo, Bio-Rad 172-1019)
- VTG padrão
- VTG purificada de *X. laevis* a 3,3 mg/ml.
- TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (por exemplo, KPL 50-76-00 ou Sigma T0440)
- Soro de cabra (NGS)(por exemplo, Chemicon® S26-100ml)
- Placas de microtitulação de 96 poços, de poliestireno EIA (por exemplo, ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)
- Forno de hibridação a 37 °C (ou incubadora de ar de equilíbrio rápido) para placas; banho-maria para tubos
- Outros equipamentos, produtos químicos e materiais comuns de laboratório.

Receitas

Tampão de revestimento (50 mM de tampão de carbonatos, pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
Água	428 ml

PBS 10X (0,1 M de fosfato, 1,5 M de NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
Água	810 ml

Tampão de lavagem (PBST):

PBS 10X	100 ml
Água	900 ml

Ajustar o pH para 7,3 com 1 M HCl e acrescentar 0,5 ml de Tween-20

Tampão de ensaio:

Soro de cabra (NGS)	3,75 ml
Tampão de lavagem	146,25 ml

Colheita de amostras

O sangue é colhido com um tubo capilar heparinizado para micro-hematócitos e colocado sobre gelo. Após centrifugação durante 3 minutos, o tubo é marcado, aberto e o plasma expelido para tubos de microcentrífuga de 0,6 ml com 0,13 unidades de aprotinina liofilizada (estes tubos são previamente preparados por adição da quantidade adequada de aprotinina, congelação e liofilização num concentrador de vácuo a baixos níveis de calor até à secagem completa). Armazenar o plasma a -80 °C até à análise.

Procedimento para uma placa

Revestimento da placa

Misturar 20 µl de VTG purificada com 22 ml de tampão de carbonatos (concentração final: 3 µg/ml). Adicionar 200 µl a cada poço de uma placa de 96 poços. Cobrir a placa com película de selagem adesiva e deixar incubar a 37 °C, durante 2 horas (ou a 4 °C, de um dia para o outro).

Bloqueio da placa

A solução de bloqueio é preparada adicionando 2 ml de soro de cabra (NGS) a 38 ml de tampão de carbonatos. Retirar a solução de revestimento e agitar até secar. Adicionar a cada poço 350 µl da solução de bloqueio. Cobrir com película de selagem adesiva e incubar a 37 °C, durante 2 horas (ou a 4 °C de um dia para o outro).

Preparação das soluções padrão

Misturar 5,8 µl de VTG purificada-padrão com 1,5 ml de tampão de ensaio, num tubo de ensaio de vidro de borossilicato descartável de 12 x 75 mm. Obtém-se assim uma concentração de 12 760 ng/ml. Em seguida, prepara-se uma diluição em série, adicionando 750 µl da diluição anterior a 750 µl de tampão de ensaio, para produzir concentrações finais de 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 e 50 ng/ml.

Preparação das amostras

Começar por uma diluição a 1:300 (por exemplo, misturar 1 µl de plasma com 299 µl de tampão de ensaio) ou a 1:30 do plasma em tampão de ensaio. Caso se preveja uma elevada concentração de VTG, poderão ser necessárias diluições suplementares ou de maiores quantidades. Tentar manter o valor B/B₀ no intervalo-padrão. Para as amostras sem VTG apreciável – por exemplo, machos e fêmeas de controlo (todos imaturos) –, utilizar a diluição a 1:30. As amostras com diluições inferiores a esta podem apresentar efeitos de matriz indesejáveis.

Além disso, recomenda-se a análise de uma amostra de controlo positivo em cada placa. Esta amostra provém de uma mistura de plasma que contém níveis elevados de VTG induzidos. A mistura de plasma é inicialmente diluída em NGS, dividida em alíquotas e armazenada a -80 °C. Para cada placa, uma alíquota é descongelada, diluída em tampão de ensaio e analisada como uma amostra de ensaio.

Incubação com o 1.º anticorpo

Preparar o 1.º Ac efetuando uma diluição a 1:2000 de soro contendo o 1.º Ac pré-adsorvido no tampão de ensaio (por exemplo, 8 µl para 16 ml de tampão de ensaio). Misturar 300 µl da solução contendo o 1.º Ac com 300 µl de amostra/padrão, num tubo de vidro. O tubo B₀ é preparado do mesmo modo, com 300 µl de tampão de ensaio e 300 µl de anticorpo. Além disso, deve preparar-se um tubo NSB com apenas 600 µl de tampão de ensaio, ou seja, sem Ac. Cobrir os tubos com Parafilm e agitar suavemente num vórtex, para misturar. Incubar durante 1 hora em banho-maria, a 37 °C.

Lavagem da placa

Lavar a placa imediatamente antes de estar concluída a incubação do 1.º Ac. Para isso, sacudir a placa para retirar o conteúdo e secá-la com papel absorvente. Depois, encher os poços com 350 µl de solução de lavagem, esvaziar e secar. Neste caso, é útil a utilização de uma pipeta de repetição multicanais ou de um lavador de placas. Repetir mais duas vezes a lavagem, para um total de três lavagens.

Carregamento da placa

Uma vez lavada a placa, retirar os tubos do banho-maria e agitar ligeiramente num vórtex. Adicionar 200 µl de cada amostra padrão B₀ e tubo NSB, para duplicar os poços da placa. Cobrir a placa com película de selagem adesiva e deixar incubar, durante 1 hora, a 37 °C.

Incubação com o 2.º anticorpo

No fim da incubação da etapa anterior, a placa deve ser novamente lavada três vezes, como descrito acima. O 2.º Ac diluído prepara-se misturando 2,5 µl do 2.º Ac com 50 ml de tampão de ensaio. Adicionar 200 µl do 2.º Ac diluído a cada poço, selar como acima indicado e incubar durante 1 hora, a 37 °C.

Adicionar um substrato

Terminada a incubação com o 2.º Ac, proceder à lavagem da placa três vezes, conforme descrito acima. Em seguida, adicionar a cada poço 100 µl de substrato TMB. Deixar reagir durante 10 minutos, de preferência ao abrigo de uma fonte de luz viva. Interromper a reação adicionando 100 µl de ácido fosfórico 1 M. A mistura irá mudar de cor, de azul para amarelo vivo. Medir a absorvância a 450 nm, utilizando um leitor de placas.

Calcular B/Bo

Subtrair o valor NSB médio de todas as medições. Calcular o valor B/B₀ para cada amostra e para cada padrão, dividindo o valor da absorvância (B) pela absorvância média da amostra (B₀).

Obter a curva padrão e determinar quantidades desconhecidas

Gerar uma curva-padrão por recurso a um software de criação de gráficos (por exemplo, Slidewrite™ ou Sigma Plot®), que irá extrapolar a quantidade de B/B₀ da amostra com base no B/B₀ dos padrões. Normalmente, a quantidade é representada por pontos numa escala logarítmica e a curva apresenta uma forma sigmoide. No entanto, pode parecer linear quando se utiliza um intervalo restrito de padrões. Corrigir as quantidades de amostra de acordo com o fator de diluição e registar em mg de VTG/ml de plasma.

Determinação dos limites mínimos de deteção (LMD)

Muitas vezes, em especial no que respeita aos machos normais, não é claro como se devem registar os resultados obtidos para valores baixos. Nestes casos, devem utilizar-se «limites de confiança» de 95 % para determinar se o valor deve ser registado como zero ou como outro número. Se o resultado da amostra se situar dentro do intervalo de confiança do padrão zero (B_0), o resultado deve ser registado como zero. O nível mínimo de deteção será o padrão mais baixo que seja consistentemente diferente do padrão zero (ou seja, os dois intervalos de confiança não se sobrepõem). Para qualquer resultado da amostra que esteja dentro do limite de confiança do nível mínimo de deteção, ou acima, regista-se o valor calculado. Se uma amostra estiver compreendida entre o padrão zero e os intervalos de confiança do nível mínimo de deteção, deve ser registada metade do nível mínimo de deteção para o valor dessa amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113-125.

Apêndice 7

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O LAGDA gera três tipos de dados a analisar estatisticamente: 1) dados quantitativos contínuos; 2) dados relativos ao tempo decorrido até ao evento, no que se refere às taxas de desenvolvimento (tempo até à fase NF62); 3) dados ordinais sob a forma de índices de gravidade ou fases de desenvolvimento a partir de avaliações histopatológicas. A figura 1 ilustra a árvore de decisão para análise estatística recomendada para o LAGDA. Além disso, indicam-se a seguir algumas anotações que podem ser necessárias para efetuar a análise estatística das medições do LAGDA. Para a árvore de decisão de análise, os resultados das medições para mortalidade, crescimento (peso e comprimento) e índice hepatossomático (IHS) devem ser analisados de acordo com «Outros parâmetros».

Dados contínuos

Numa primeira fase, verifica-se se os dados relativos aos parâmetros contínuos são monótonos, transformando-os em classes e, em seguida, procedendo a uma análise de variância (ANOVA) e comparando os contrastes lineares e quadráticos. Se os dados forem monótonos, convém aplicar o teste de Jonckheere-Terpstra às medianas dos replicados, não devendo ser efetuadas quaisquer análises subsequentes. No caso de dados de distribuição normal com variâncias homogéneas, também é aplicável o teste de Williams. Se os dados não forem monótonos (o contraste quadrático é significativo e o linear não o é), convém analisá-los utilizando um modelo ANOVA com efeitos mistos. Em seguida, os dados devem ser avaliados quanto à normalidade (utilizando, de preferência, o teste de Shapiro-Wilk ou o teste de Anderson-Darling) e à homogeneidade da variância (de preferência utilizando o teste de Levene). Ambos os ensaios são realizados com os resíduos do modelo ANOVA de efeitos mistos. Embora sejam preferíveis, os testes formais de normalidade e homogeneidade da variância podem ser substituídos pelo recurso a um parecer de peritos. Se os dados apresentarem uma distribuição normal e variâncias homogéneas, as hipóteses do modelo ANOVA com efeitos mistos são verificadas e o teste de Dunnett permite determinar os efeitos significativos do tratamento. Sempre que se verifique anormalidade ou heterogeneidade da variância, os pressupostos do teste de Dunnett são violados e procura-se transformar os dados para obter a sua distribuição normal e estabilizar a variância. Se não se encontrar uma transformação deste tipo, determina-se um efeito de tratamento significativo com um teste de Dunn. Sempre que possível, deve realizar-se um teste unilateral, por oposição a um teste bilateral, mas tal exige o parecer de um perito para determinar qual o teste mais adequado para um determinado parâmetro.

Mortalidade

Os dados relativos à mortalidade devem ser analisados durante todo o ensaio e expressos em percentagem de peixes mortos num determinado viveiro. Os girinos que não tenham completado a metamorfose num dado período, os girinos que se encontrem na coorte das subamostras de larvas, as rãs juvenis selecionadas e todos os animais mortos devido a erro experimental devem ser considerados dados censurados e não devem ser incluídos no denominador do cálculo da percentagem. Antes de se proceder a qualquer análise estatística, as percentagens de mortalidade devem ser objeto de transformação do arco seno da raiz quadrada. A alternativa é utilizar o teste de Cochran-Armitage, com um eventual ajustamento de Rao-Scott em caso de sobredispersão.

Peso e comprimento (dados relativos ao crescimento)

Os machos e as fêmeas não são sexualmente dimórficos durante a metamorfose, pelo que os dados relativos ao crescimento da subamostra de larvas devem ser analisados independentemente do sexo. No entanto, os dados relativos ao crescimento dos juvenis devem ser analisados separadamente, em função do sexo genético. Pode ser necessária uma transformação logarítmica para estes parâmetros, uma vez que não é raro os dados relativos ao tamanho seguirem uma lei logarítmica normal.

Índice hepatossomático (IHS)

Os pesos hepáticos devem ser normalizados como proporções do peso corporal total (ou seja, IHS) e analisados separadamente com base no sexo genético.

Tempo até à fase NF62

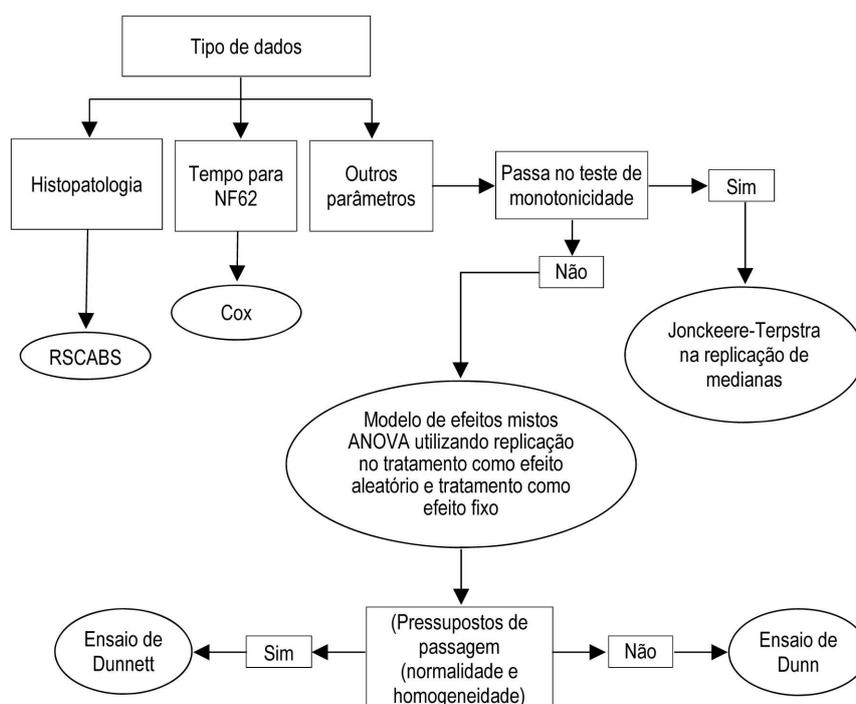
Os dados relativos ao tempo decorrido até à metamorfose devem ser tratados como dados até ao evento, sendo quaisquer mortalidades ou indivíduos que não atinjam a fase NF62 em 70 dias tratados como dados censurados à direita (ou seja, o valor verdadeiro é superior a 70 dias, embora o estudo termine antes de os animais terem atingido a fase NF62 em 70 dias). O tempo mediano até à fase NF62, que corresponde à conclusão da metamorfose nos controlos com água de diluição, deve ser utilizado para determinar a data de conclusão do ensaio. O tempo mediano até à conclusão da metamorfose pode ser determinado pelos estimadores produto-limite de Kaplan-Meier. Este parâmetro deve ser analisado por recurso a um modelo de riscos proporcionais de Cox com efeitos mistos, que tenha em conta a estrutura dos replicados do estudo.

Dados histopatológicos (índices de gravidade e fases de desenvolvimento)

Os dados histopatológicos assumem a forma de um índice da gravidade ou de fases de desenvolvimento. Um teste de tendência de Cochran-Armitage com correção do tipo Rao-Scott (RSCABS, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) é aplicado a cada nível de gravidade numa resposta histopatológica (Green *et al.*, 2014). A correção de Rao-Scott permite que seja tido em conta no ensaio o plano da experiência adotado para os replicados. O procedimento «by Slices» incorpora as expectativas biológicas de que a gravidade dos efeitos tende a aumentar com o aumento das doses ou concentrações, mantendo os índices dos indivíduos e indicando a gravidade dos efeitos detetados. O procedimento RSCABS não só determina quais os tratamentos que são estatisticamente diferentes dos controlos (ou seja, que têm uma patologia mais grave do que os controlos), mas também determina a que índice de gravidade a diferença ocorre, proporcionando assim o contexto tão necessário à análise. No caso da determinação da fase de desenvolvimento das gónadas e dos ductos reprodutores, convém submeter os dados a uma manipulação suplementar, uma vez que uma das hipóteses do RSCABS é que a gravidade do efeito aumenta com a dose. O efeito observado pode ser um atraso ou uma aceleração do desenvolvimento. Por conseguinte, os dados relativos à determinação da fase de desenvolvimento devem ser analisados tal como foram comunicados para detetar uma eventual aceleração do desenvolvimento e, em seguida, invertidos manualmente antes de uma segunda análise para detetar um eventual atraso no desenvolvimento.

Figura 1

Árvore de decisão para análise estatística para os dados LAGDA



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

Apêndice 8

ELEMENTOS A TER EM CONTA PARA O ACOMPANHAMENTO E A MINIMIZAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ESCOLIOSE

A escoliose idiopática, geralmente manifestada por uma cauda dobrada nos girinos de *Xenopus laevis*, pode complicar as observações morfológicas e comportamentais nas populações de ensaio. Devem ser envidados esforços para minimizar ou eliminar a incidência de escoliose, tanto nas populações de reserva como em condições experimentais. No ensaio definitivo, recomenda-se que a prevalência de escoliose moderada e grave seja inferior a 10 %, a fim de reforçar a confiança na capacidade do ensaio para detetar efeitos no desenvolvimento relacionados com o tratamento em larvas de anfíbios de outro modo saudáveis.

As observações diárias durante o ensaio definitivo devem registar tanto a incidência (contagem individual) como a gravidade da escoliose, quando presente. A natureza da anomalia deve ser descrita no que diz respeito à localização (por exemplo, anterior ou posterior à cloaca) e à direção da curvatura (por exemplo, lateral ou dorso-ventral). A gravidade pode ser classificada como se segue:

(NO) não observada: ausência de curvatura

(1) Mínima: ligeira curvatura lateral posterior à cloaca; apenas visível em repouso

(2) Moderada: curvatura lateral posterior à cloaca; sempre visível, mas sem inibir o movimento

(3) Grave: curvatura lateral anterior à cloaca, OU qualquer curvatura que iniba o movimento, OU qualquer curvatura dorso-ventral

Um painel científico consultivo da US EPA sobre a lei FIFRA (FIFRA SAP 2013) analisou dados recapitulativos sobre a escoliose resultantes de quinze ensaios de metamorfose de anfíbios com *X. laevis* (fase NF51 a 60+) e formulou recomendações gerais para reduzir a prevalência desta anomalia nas populações de ensaio. Estas recomendações são relevantes para o LAGDA, embora este ensaio implique um calendário de desenvolvimento mais longo.

Dados históricos relativos à desova

De um modo geral, devem utilizar-se como casais reprodutores adultos saudáveis de alta qualidade; a eliminação de casais reprodutores que produzem descendência com escoliose pode minimizar a ocorrência desta ao longo do tempo. Especificamente, pode ser benéfico minimizar a utilização de casais reprodutores capturados na natureza. O período de exposição do LAGDA começa com embriões na fase NF8-10; não é possível prever, à partida, se determinados indivíduos irão ou não apresentar escoliose. Assim, para além de acompanhar a incidência de escoliose nos animais de ensaio, devem documentar-se os dados históricos relativos às massas de ovos – incluindo a prevalência de escoliose em quaisquer larvas autorizadas a desenvolver-se. Pode ser útil monitorizar melhor a parte de cada massa de ovos não utilizada num determinado estudo e comunicar essas observações (FIFRA SAP 2013).

Qualidade da água

É importante garantir a qualidade da água, tanto nas reservas do laboratório como durante o ensaio. Para além dos critérios de qualidade da água avaliados regularmente para os ensaios de toxicidade em meio aquático, pode ser útil monitorizar e corrigir eventuais deficiências de nutrientes (por exemplo, deficiência de vitamina C, cálcio, fósforo) ou níveis excessivos de selénio e de cobre, que se sabe poderem causar escoliose em diferentes graus em *Rana* sp. de criação laboratorial e em *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; como indicado em FIFRA SAP 2013). A utilização de um regime alimentar adequado (ver apêndice 4) e a limpeza regular dos viveiros permitem, em geral, melhorar a qualidade da água e a saúde dos espécimes de ensaio.

Regime alimentar

O apêndice 4 contém recomendações específicas relativas ao regime alimentar, considerados eficazes no âmbito do LAGDA. Recomenda-se que as fontes de alimentos sejam analisadas para deteção de toxinas biológicas, herbicidas e outros pesticidas que se saiba causarem escoliose em *X. laevis* ou noutros animais aquáticos (Schlenk e Jenkins 2013). Por exemplo, a exposição a determinados inibidores da colinesterase foi associada à escoliose nos peixes (Schultz *et al.* 1985) e nas rãs (Bacchetta *et al.* 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, and P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21 a 23 de maio de 2013. Washington, DC.»
