



Conselho da
União Europeia

Bruxelas, 25 de fevereiro de 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 1

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

NOTA DE ENVIO

de:	Comissão Europeia
data de receção:	22 de fevereiro de 2019
para:	Secretariado-Geral do Conselho

Assunto:	ANEXO do REGULAMENTO (UE) .../... DA COMISSÃO de XXX 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)

Envia-se em anexo, à atenção das delegações, o documento D060575/02 - Anexo.

Anexo: D060575/02 - Anexo

PT

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. Este 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 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 cutânea e de corrosão cutânea dos produtos químicos e ii) propõe uma abordagem quando há necessidade de ensaios complementares (1). Além disso, 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 deste 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 ensaia 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» neste 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 de tempo 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 hamsters 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 elastogénicos.

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 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 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 o precipitado 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 controles positivos.

Condição de ativação metabólica	Locus	Substância e n.º CAS
Ausência de ativação metabólica exógena	<i>Hprt</i>	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]
	<i>xprt</i>	Estreptonigrina (n.º CAS 3930-19-6) Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7]
Presença de ativação metabólica exógena	<i>Hprt</i>	3-Metilcolantreno [n.º CAS 56-49-5] 7,12-Dimetilbenzantraceno [n.º CAS 57-97-6] Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8]
	<i>xprt</i>	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 de tempo 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 colônias contadas (ou o número de poços sem colônias no método de micropoços) nas placas, com e sem agente seletivo. A frequência de mutação é calculada com base no número de colônias 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 Nitrilotriacetic 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.*, 584 1–256.
- (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. (Manuscript in preparation).
- (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., Tate 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 Cammalian 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 McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, 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

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

Produto químico: uma substância ou mistura.

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

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

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).

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.

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

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

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

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

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

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.

Período de expressão fenotípica: o período de tempo 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 caráter fenotípico.

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 controles negativos (com uma taxa de sobrevivência de 100 %).

Fração S9 de fígado: sobrenadante após centrifugação do homogeneizado hepático a 9000 g (extrato hepático em bruto).

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

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.

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

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.

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:

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

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

«B.22 ENSAIO DE LETALIDADE DOMINANTE NO ROEDOR

INTRODUÇÃO

45. 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).
46. 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.
47. 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.
48. 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.

49. Os termos-chave são definidos no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

50. 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.
51. 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).
52. 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

53. 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

54. 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

55. 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

56. 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

57. 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 $\pm 20\%$ do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

58. 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

59. 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

60. 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.
61. 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

62. 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**

63. 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).
64. 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

65. 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.
66. 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.
67. 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

68. 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).
69. A DMT também não deve afetar negativamente o êxito do acasalamento (21).

70. 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.
71. 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 2000 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

72. 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 qualquer 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

73. 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 detecção 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

74. 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 detecção de efeitos letais dominantes, a fim de determinar o número de implantes, de embriões vivos e mortos e de corpos lúteos.
75. 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 detecção 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

76. 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.
77. 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.
78. 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.

79. O fator de letalidade dominante é estimado do seguinte modo: (mortes após a implantação/total de implantações por fêmea) $\times$ 100.
80. Devem ser comunicados os dados relativos à toxicidade e aos sinais clínicos, em conformidade com o ponto 29.

Critérios de aceitabilidade

81. 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

82. Devem ser analisados pelo menos três grupos tratados, de modo a proporcionar dados suficientes para uma análise da resposta à dosagem.
83. 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.

84. 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.

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

86. 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).

87. 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.

88. 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).

89. Um ensaio de DL positivo fornece provas da genotoxicidade do produto químico em estudo nas células germinais do macho tratado da espécie de ensaio.

90. 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

91. 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., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, 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

Produto químico: uma substância ou mistura.

Corpo lúteo: a 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.

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

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

Intervalo de acasalamento: o período de tempo 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, espermatídios condensados, espermatídios redondos, espermatócitos paquítenos, espermatócitos precoces, espermatogónias diferenciadas, espermatogónias diferenciadoras, e células espermatogónias estaminais.

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

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

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

Apêndice 2

OPORTUNIDADE DA ESPERMATOGÊNESE NOS MAMÍFEROS

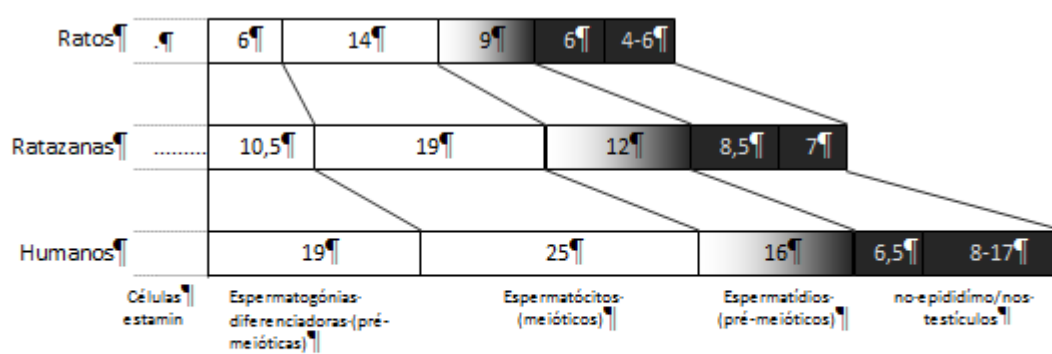


Fig. 1: Comparação da duração (dias) do desenvolvimento de células germinais masculinas em ratos, ratazanas e seres humanos. A reparação do ADN não ocorre durante os períodos indicados pelo sombreado.

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 espermatogênese nos ratos, ratazanas e seres humanos (extraído de Adler, 1996). As espermatogônias indiferenciadas incluem: espermatogônia 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 espermatogónias de mamífero consiste em identificar os produtos químicos que causam aberrações cromossómicas estruturais nas células espermatogónias 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 espermatogónias 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 (espermatogónias) e meióticas (espermatócitos). 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 espermatogónias. O presente método de ensaio visa outros tipos de células.

6. Para detetar aberrações cromatídicas em células espermatogónias 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 espermatogónias (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 espermatogónias expostas. A maioria das células mitóticas nos preparativos do testículo são espermatogónias 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 conjunção 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 cromossômica 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 cromossômicas 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 cromossômicas 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 conjunção 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 ratas, 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 2000 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 seleccionar-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 concepção 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. A injeção intraperitoneal não é, normalmente, recomendada – a menos que se justifique cientificamente –, uma vez que, em geral, 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 cromossômicas nas células espermatogônias 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 cromossômicas 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 cromossômicas 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 cromossômicas 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 endorreduplicadas;

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

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.

Produto químico: uma substância ou mistura.

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

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

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

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

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

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 cromossômicas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossômicos 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.

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 cromossômicas).

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

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

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.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este 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).

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.

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 ratazanas (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.
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 deste método de ensaio, 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 aplicável determinará a forma como o método de ensaio será aplicado. Embora não forneça informações adequadas sobre a irritação da pele, deve notar-se que o método de ensaio 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, nos casos em que puder ser demonstrada a sua inaplicabilidade 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. 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 – 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 ratas 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 ratas, 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 iônica 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 referência¹

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	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-triazol	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

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
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; ND = não determinado.

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

16. 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.
17. 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. O tubo 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.
18. 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

19. 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.
20. Os produtos químicos em estudo líquidos são aplicados uniformemente (150 μl) 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 μl) 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 1000 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 2000 H, 2000 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 clip*) 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 seleccionadas 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, tensioativas (detergentes, emulsionantes e outras substâncias tensioativas), 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 deverão 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.

Critérios 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 (μ g/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. Quando a classificação do produto químico em estudo é 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, 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 (controles 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

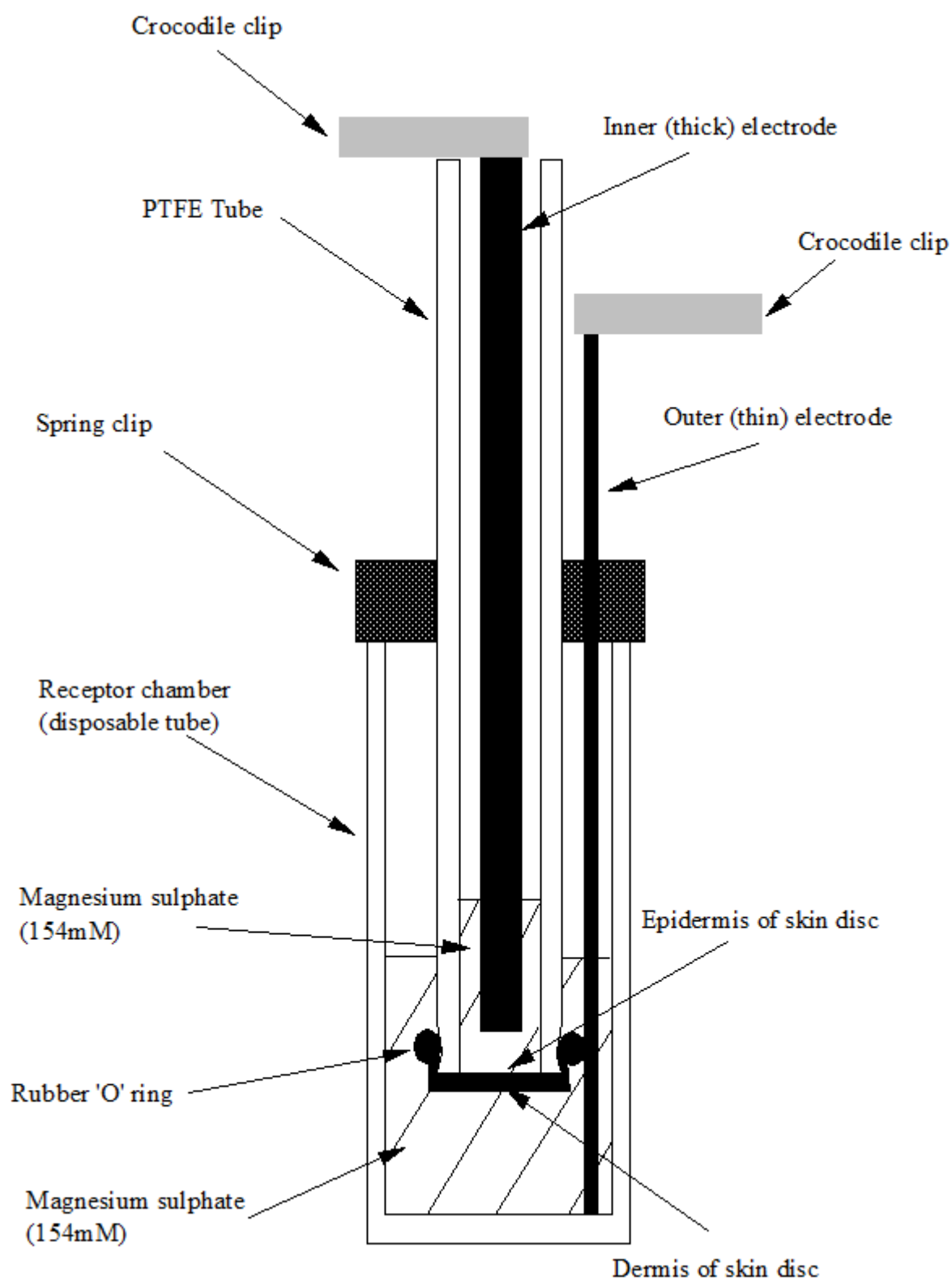
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (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: [\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html\]](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., 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. *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., Brüscheiler 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



Legenda:

Pinça-crocodilo

Tubo de PTFE

Tampa-suporte de molas

Câmara do recetor (tubo descartável)

Sulfato de magnésio (154 mM)

Eléctrodo interior (espesso)

Eléctrodo exterior (fino)

Pinça-crocodilo

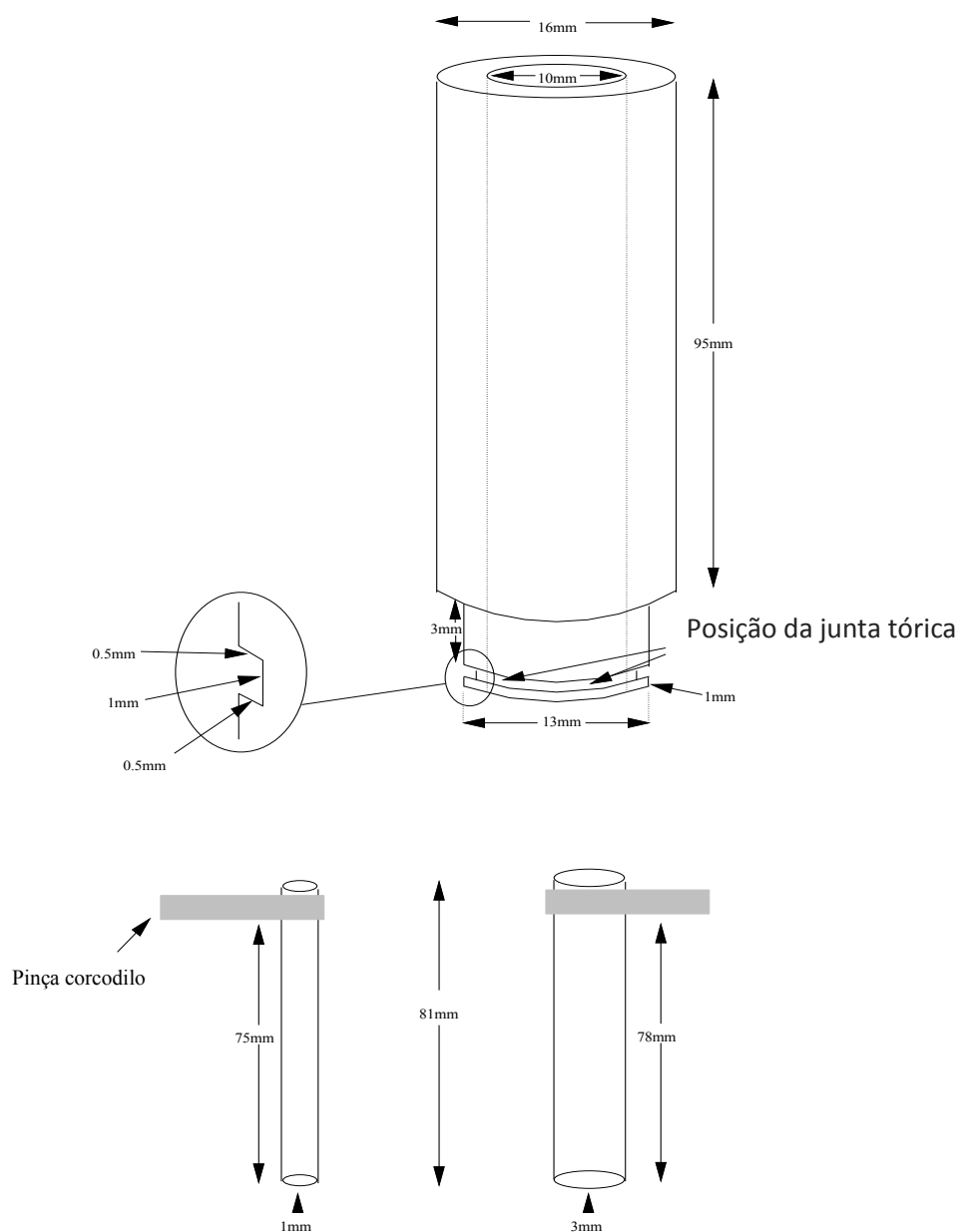
Epiderme do disco de pele

Derme do disco de pele

Junta tórica em borracha

Sulfato de magnésio (154 mM)

FIGURA 2: DIMENSÕES DO TUBO DE POLITETRAFLUOROETILENO (PTFE) E DO TUBO RECETOR, BEM COMO DOS ELÉTRODOS UTILIZADOS



Fatores críticos da montagem ilustrada:

- Diâmetro interno do tubo de PTFE;
- Comprimento dos elétrodos em relação ao tubo de PTFE e ao tubo recetor, para que os elétrodos não toquem no disco cutâneo e de modo que um comprimento fixo de elétrodo 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 elétrica seja uma medida fíável das propriedades da pele.

Apêndice

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (20).

C: Corrosivo

Produto químico: uma substância ou mistura.

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).

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.

DO: Densidade ótica.

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 controle, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

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.

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).

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).

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).

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.

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).

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.

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

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

Resistência elétrica transcutânea (RET): valor da resistência em $k\Omega$ 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.

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 EPIDERMES HUMANAS 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

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.

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 MRV EpiDerm™ de acordo com a validação baseada em PS (16)(17)(18). Trata-se de SkinEthic™ RHE¹ 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).
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

¹ 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.

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. Corrobora 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 teste incluídos neste método de ensaio, 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 este 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 baseia-se 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 referência¹

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 glioxílico mono-hidratado	563-96-2	Ácido orgânico	1B e 1C	(3) 1B e 1C	—	S
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	Y	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	Y	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	Y	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

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 por este 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 EPIDERMES HUMANAS RECONSTRUÍDAS

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: Critérios 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 humidificada 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 ± 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 occisão 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 ± 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 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}).

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 % NSC_{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.

Crítérios 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*
≥ 25 % após 3 min de exposição	Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e
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
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

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).

Crêterios 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  tica (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  tica (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 cr terios de aceitação de ensaios e séries de ensaios definidos;
- Descrição de outros efeitos eventualmente observados;
- Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os cr terios 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., 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. *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:
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (25).

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.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

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).

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.

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.

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.

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

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

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

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.

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

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

NSMTT: Redução não específica do MTT.

DO: Densidade ótica.

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.

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).

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).

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).

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.

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).

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.

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).

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.

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

UPLC: Cromatografia líquida de alta resolução.

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

Apêndice 2

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

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
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

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Doses e aplicação do tratamento	<u>Líquidos e viscosos</u>: 50 µl ±3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Sólidos</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ±5µl de solução de NaCl (9 g/l) Cerosos/aderentes: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) com uma malha de <i>nylon</i>	<u>Líquidos</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²), com ou sem malha de <i>nylon</i> <i>Compatibilidade do produto químico com a malha de nylon antes do ensaio</i> <u>Semissólidos</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Sólidos</u>: 25 µl H₂O (ou mais, se necessário) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <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.	<u>Líquidos e viscosos</u>: 40 µl ±3µl (80 µl/cm²) com malha de <i>nylon</i> <i>Compatibilidade do produto químico com a malha de nylon antes do ensaio</i> <u>Sólidos</u>: 20 µl ±2µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) Cerosos/aderentes: 20 3 mg (40 mg/cm 2) com malha de <i>nylon</i>	<u>Líquidos</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) com malha de nylon <i>Compatibilidade do produto químico com a malha de nylon antes do ensaio</i> <u>Semissólidos</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Sólidos</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (ou mais, se necessário) <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.
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% CO₂, 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% CO₂, 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 CO₂, 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% CO₂, 95% HR → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados.

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
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 estudo 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
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

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Amostra de controle 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 % HR	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
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
Controle da qualidade dos tecidos	18 horas de tratamento com SDS 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	Tratamento com 1 % Triton X-100 4,08 horas ≤ ET ₅₀ ≤ 8,7 horas	Tratamento com 1 % Triton X-100 4,0 horas ≤ ET ₅₀ ≤ 10,0 horas	Tratamento com 1 % Triton X-100 2,0 horas ≤ ET ₅₀ ≤ 7,0 horas

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Critérios de aceitabilidade	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. 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 4 horas com controlo positivo (ácido acético glacial), expressa em % do controlo negativo, deve ser ≤ 20 % 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 %.	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. 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 %. 3. No intervalo de viabilidade de 20-100 %, o coeficiente de variação (CV) entre os tecidos replicados deve ser ≤ 30 %.	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. 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 1 hora (e 4 horas, se aplicável) com controlo positivo (KOH 8 N), expressa em % do controlo negativo, deve ser < 15 %. 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 %	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. 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 1 hora com controlo positivo (KOH 8 N), expressa em % do controlo negativo, deve < 20 %. 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 %

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

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)	$\text{Area}_{\text{interferência}} \leq 20\% \text{ of } \text{Area}_{\text{LLOQ}}^1$
Precisão	Controlos de qualidade (MTT formazano a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) em isopropanol (n = 5)	$\text{CV} \leq 15\% \text{ ou } \leq 20\% \text{ para o LLOQ}$
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	$\text{Area}_{\text{interferência}} \leq 20\% \text{ of } \text{Area}_{\text{LLOQ}}$
Reprodutibilidade (intradiária)	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: $\% \text{ Dev} \leq 15\% \text{ e } \text{CV} \leq 15\%$
Reprodutibilidade (intradiária)	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)	$\% \text{ Dev} \leq 15\%$

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

2ULOQ: Limite superior de quantificação, definido para ser duas vezes superior à mais elevada concentração de formatazano 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 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

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).

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.

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 inciduiu 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 competência¹

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)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

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 TG.

Quadro 3: Critérios 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 espetrometria 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 (reduzidor do MTT), for naturalmente corado ou adquirir coloração durante o tratamento dos tecidos, devem ser utilizados produtos químicos de controlo suplementares, que permitam detetar interferências do produto químico em estudo na técnica de medição da viabilidade e corrigir esse efeito (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 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}).

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 NCS_{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.

Critérios 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

±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 redutores 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 Rubinstein, 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

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

Viabilidade celular: Parâmetro que mede a atividade total de uma população celular (por exemplo, em termos de capacidade das desidrogenases mitocondriais celulares para reduzirem o corante vital MTT [brometo de 3-(4,5-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.

Produto químico: uma substância ou mistura.

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).

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.

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).

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.

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.

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).

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

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.

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

NSC: 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).

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.

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

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

Ensaio alternativo: Ensaio destinado a substituir um ensaio de rotina aceite para

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

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.

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).

Irritação da pele *in vivo*: Produção de danos reversíveis na pele por aplicação do produto químico em estudo durante, no máximo, quatro horas. A irritação cutânea é uma reação local do tecido cutâneo afetado e surge pouco depois do estímulo (38). É causada por uma reação inflamatória local que envolve o sistema imunitário inato (não específico) do tecido cutâneo. A sua característica principal é a reversibilidade do processo, no qual se produzem reações inflamatórias e surge a maior parte dos sinais clínicos característicos das irritações associadas a processos inflamatórios (eritema, edema, prurido e dor).

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

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.

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

UPLC: Cromatografia líquida de alta resolução.

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

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) do Test Guideline 439 da OCDE (8), que se baseiam nas PS* do ECVSM (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) e PS deste Test Guideline (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/cm²)	30µl (47 µl/cm²)	16µl (32 µl/cm²)	25µl (83 µl/cm²)
Para sólidos	10 mg (26 mg/cm²) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm²) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + DW (25µl)
Utilização de malha de <i>nylon</i>	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 RECONSTRUÍDA

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)	$Area_{interferência} \leq 20\%$ 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)	$CV \leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ para o LLOQ
Exatidão	Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	$\% Dev \leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ para LLOQ
Efeito matriz	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 5)	$85\% \leq$ Efeitos matriz $\% \leq 115\%$
Passagem	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ ²	$Area_{interference} \leq 20\%$ of $Area_{LLOQ}$
Reprodutibilidade (intradiária)	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: $\% Dev \leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ para LLOQ
Reprodutibilidade (intradiária)	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: $\% Dev \leq 15\%$ 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	$\% Dev \leq 15\%$
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)	$\% Dev \leq 15\%$

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

²ULOQ: 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 seleccionada 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 seleccionar-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 (detecção 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 pseudogravidez (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, UVC 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 seleccionar 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 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. 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 17β-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.

Produto químico: uma substância ou mistura.

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.

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.

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.

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

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

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.

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

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

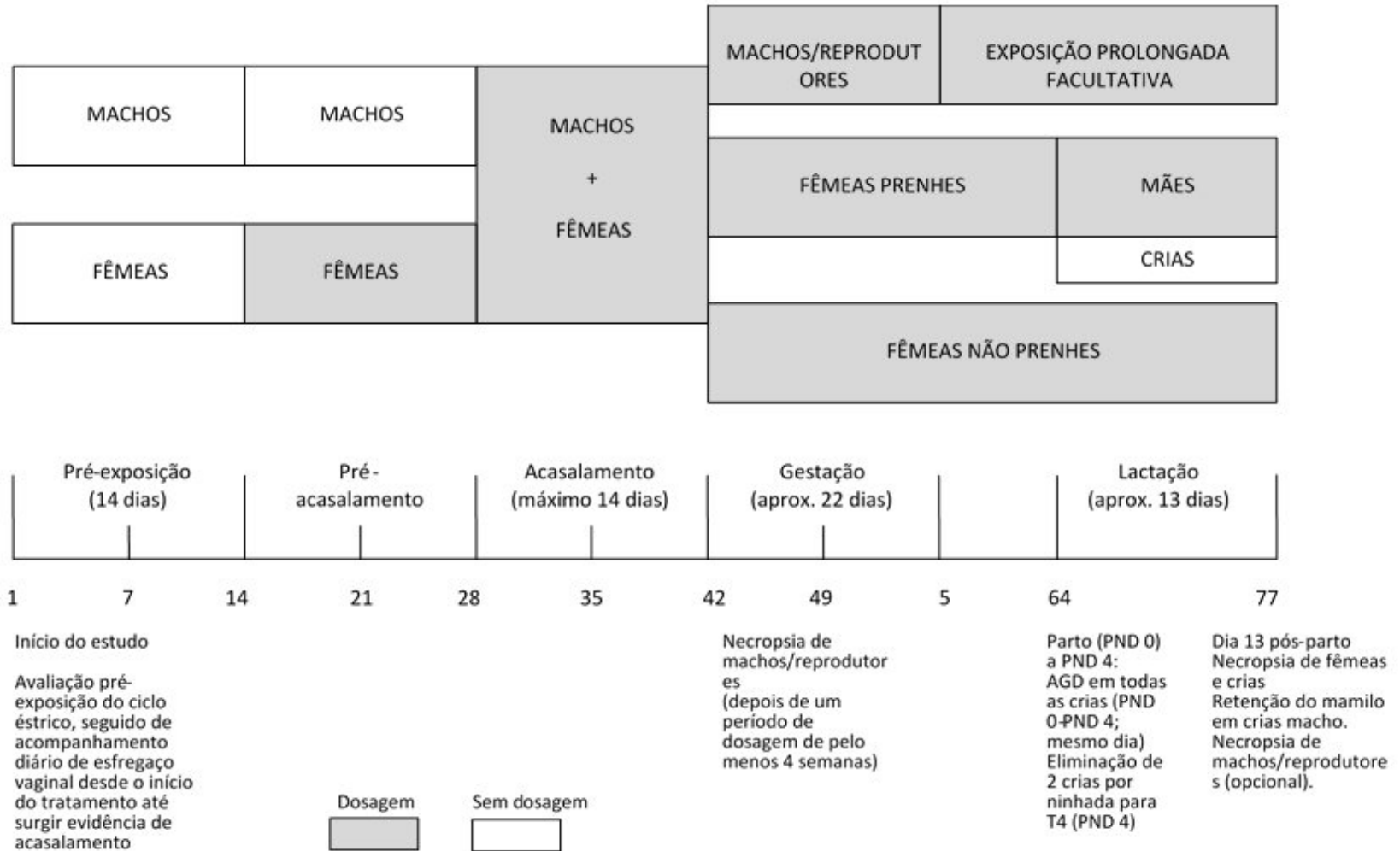
Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

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

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				
Dosagem (unidades)	0 (controle)	.. .	.. .	.. .	.. .
Pares iniciais (N)					
Ciclo éstrico (pelo menos, a duração média 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)					
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)					

⁽¹⁾ Último dia do período de acasalamento

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, 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					

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 suscitem 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 concetual 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 sistêmica, 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 sistêmica 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 sistêmica 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 (sistêmicos).
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 concepção, 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 detecção 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 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 noutro 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 seleccionar-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 dos produtos químicos 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 ratas em laboratórios diferentes, sendo, por exemplo, às 10 semanas nas ratas Sprague Dawley e cerca das 12 semanas nas ratas 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 propriocetivos) (8) (9) (11), da força de preensão (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 sangue¹. Os

¹ No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejem 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

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».

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.

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.

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 indiquem 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, UVC 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 ratas, 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 seleccionar 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.

Produto químico: uma substância ou mistura.

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.

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.

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

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.

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

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

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.

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

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

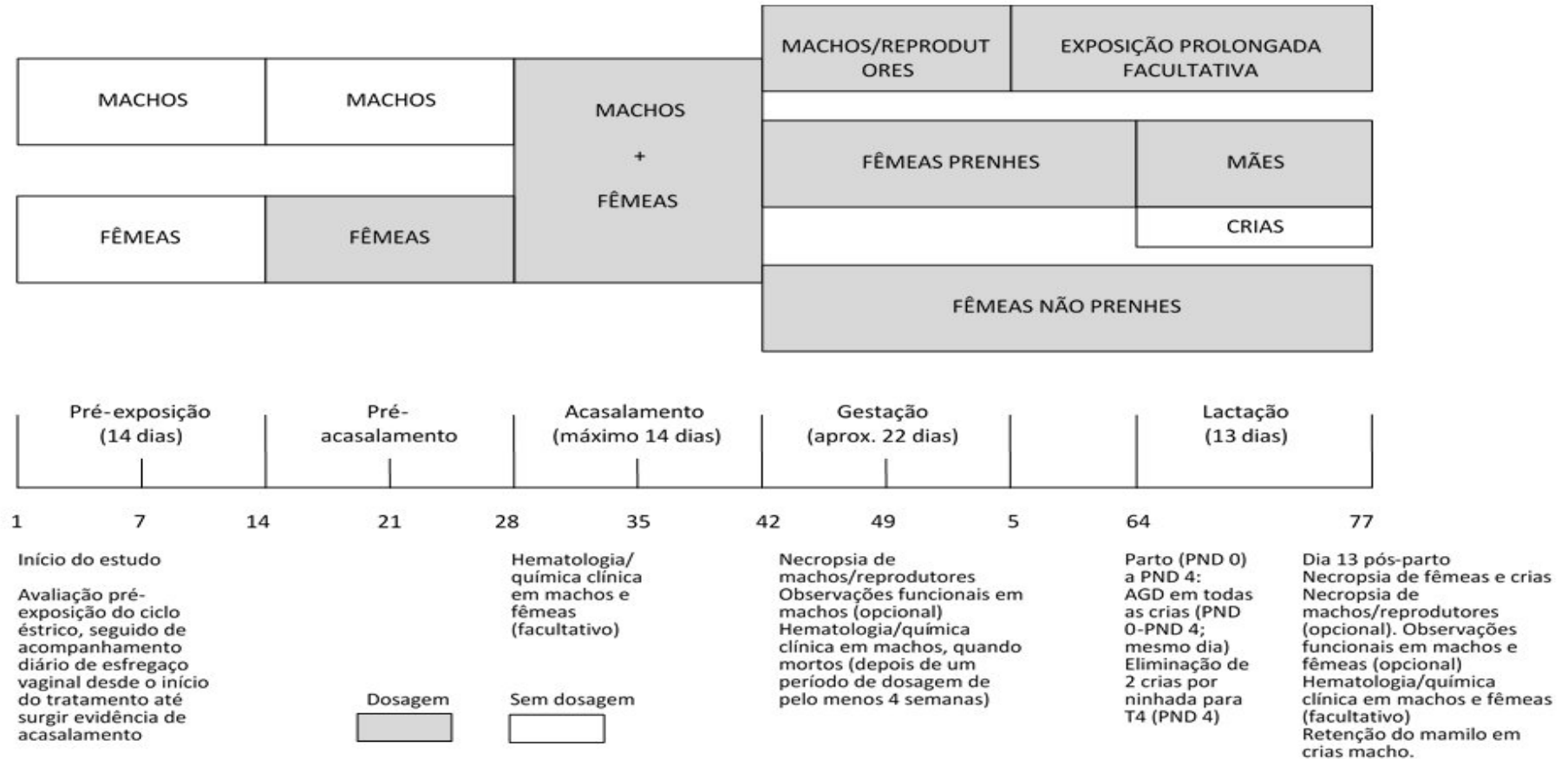
Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

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

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				
Dosagem (unidades).....	0 (controle)	...	...	...	...
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)					
Peso das crias no dia 4 (média)					
Peso das crias no dia 13 (média)					

⁽¹⁾ Último dia do período de acasalamento

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					

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

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).

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 ácidos¹ 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 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 (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

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

¹ «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.

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 biobarreira 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 competência¹

Substância ²	N.º CAS	Classe química	Subcategoria <i>in vivo</i> do sistema GHS	Subcategoria <i>in vitro</i> do sistema GHS

			da ONU ³	da ONU ³
Trifluoreto de boro di-hidratado	13319-75-0	Ácido inorgânico	1A	1A
Ácido nítrico	7697-37-2	Ácido inorgânico	1A	1A
Pentacloreto 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
<i>N,N</i> -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

¹As 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

13. 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.

Controles

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).

³As 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 detecção;
- 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), First 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), Ispira, 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

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).

Produto químico: uma substância ou mistura.

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.

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).

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.

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.

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).

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).

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).

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).

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).

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.

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

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

B.66 ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO TRANSFETADA COM ESTABILIDADE PARA DETECÇÃO 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 (ensaio 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 line¹ 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

¹ Até junho de 2016, esta linha celular designava-se BG1Luc. As células BG-1 foram inicialmente descritas por Geisinger *et al.* (1998) (35) e posteriormente caracterizadas por investigadores do National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Recentemente, constatou-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) (37), 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 (38), 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, isto não afeta os estudos de validação publicados nem a utilidade e aplicação deste ensaio para rastreio de produtos químicos estrogénios/antiestrogénios.

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 STTA2			Ensaio VM7Luc ER TA2		Fonte de dados para classificação ⁴		
			ER TA Atividade	Valor PC10 (M)	Valor PC ₅₀ (M)	Atividade ER TA	Valor EC ₅₀ b,3 (M)	Outros ER TAsc	ER Ligante	Uterotrófico
1	17β-Estradiol ^a	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 ^a	57-91-0	POS	7,24 × 10-11	6,44 × 10-10	POS	1,40 × 10-9	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-Etinilestradiol ^a	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-Nortestosterona ^a	434-22-0	POS	9,64 × 10-9	2,71 × 10-7	POS	1,80 × 10-6	POS(4/4)	POS	POS
6	4-Cumilfenol ^a	599-64-4	POS	1,49 × 10-7	1,60 × 10-6	POS	3,20 × 10-7	POS(5/5)	POS	NT
7	4- <i>terc</i> -Octilfenol ^a	140-66-9	POS	1,85 × 10-9	7,37 × 10-8	POS	3,19 × 10-8	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenina ^a	520-36-5	POS	1,31 × 10-7	5,71 × 10-7	POS	1,60 × 10-6	POS(26/26)	POS	NT
9	Atrazina ^a	1912-24-9	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (30/30)	NEG.	NT
10	Bisfenol A ^a	80-05-7	POS	2,02 × 10-8	2,94 × 10-7	POS	5,33 × 10-7	POS(65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B ^a	77-40-7	POS	2,36 × 10-8	2,11 × 10-7	POS	1,95 × 10-7	POS(6/6)	POS	POS
12	Ftalato de benzilo e butilo ^a	85-68-7	POS	1,14 × 10-6	4,11 × 10-6	POS	1,98 × 10-6	POS(12/14)	POS	NEG.
13	Corticosterona ^a	50-22-6	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (6/6)	NEG.	NT
14	Cumesterol ^a	479-13-0	POS	1,23 × 10-9	2,00 × 10-8	POS	1,32 × 10-7	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzeína ^a	486-66-8	POS	1,76 × 10-8	1,51 × 10-7	POS	7,95 × 10-7	POS(39/39)	POS	POS
16	Dietilestilbesterol ^a	56-53-1	POS	<1,00 × 10-11	2,04 × 10-11	POS	3,34 × 10-11	POS(42/42)	POS	NT
17	Ftalato de di- <i>n</i> -butilo	84-74-2	POS	4,09 × 10-6		POS	4,09 × 10-6	POS(6/11)	POS	NEG.
18	Etilparabeno	120-47-8	POS	5,00 × 10-6	(no PC ₅₀)	POS	2,48 × 10-5	POS		NT
19	Estrona ^a	53-16-7	POS	3,02 × 10-11	5,88 × 10-10	POS	2,34 × 10-10	POS(26/28)	POS	POS
20	Genisteína ^a	446-72-0	POS	2,24 × 10-9	2,45 × 10-8	POS	2,71 × 10-7	POS(100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT
22	Campferol ^a	520-18-3	POS	1,36 × 10-7	1,21 × 10-6	POS	3,99 × 10-6	POS(23/23)	POS	NT
23	Clordecona ^a	143-50-0	POS	7,11 × 10-7	7,68 × 10-6	POS	4,91 × 10-7	POS(14/18)	POS	NT
24	Cetoconazol	65277-42-1	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT

25	Linurão ^a	330-55-2	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (8/8)	NEG.	NT
26	<i>meso</i> -Hexestero ^l ^a	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	Metiltestosterona ^a	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 ^a	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	<i>p,p'</i> -Metoxicloro ^a	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 ^a	57-30-7	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT
32	Reserpina	50-55-5	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (4/4)	NEG.	NT
33	Espironolactona ^a	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 um produto químico em estudo em que a resposta é 10 % (ou 50 % para PC₅₀) da resposta induzida pelo controlo positivo (E2, 1nM) em cada placa.

^a 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)].

^b 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).

^c 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 PC_x fornece informações úteis.

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

	Substância ^a	N.º CAS	Ensaio ER STTA ¹		Ensaio VM7Luc ER TA ²		Efeitos candidatos ER STTA ⁴	Classificação consensual do ICCVAM ⁵	Classe de produtos químicos MeSH ⁶	Classe de produtos ⁷
			Atividade ER TA	Valor IC ₅₀ ^b (M)	Atividade ER TA	Valor IC ₅₀ ^{b,3} (M)				
1	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	POS moderado	POS	Hidrocarboneto 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	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG.	—	POS moderado	NEG.	Esteróide	Produtos farmacêuticos
4	Raloxifeno-HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	POS moderado	POS	Hidrocarboneto cíclico	Produtos farmacêuticos
5	Tamoxifeno	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Hidrocarboneto 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
8	Atrazina	1912-24-9	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	PN	Composto heterocíclico	Herbicida
9	Ftalato de di- <i>n</i> -butilo	84-74-2	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	NEG.	Éster de ácido ftálico	Ingrediente cosmético, produto químico industrial, plastificante
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG.	—	NEG.	—	não ensaiado	PN	Composto heterocíclico, pirimidina	Fungicida
11	Flavona	525-82-6	NEG.	—	NEG.	—	PN	PN	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
12	Flutamida	13311-84-7	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	PN	Amida	Produto farmacêutico, agente veterinário
13	Genisteína	446-72-0	NEG.	—	NEG.	—	PN	NEG.	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
14	<i>p</i> - <i>n</i> -Nonilfenol	104-40-5	NEG.	—	NEG.	—	não ensaiado	NEG.	Fenol	Produto químico intermédio
15	Resveratrol	501-36-0	NEG.	—	NEG.	—	PN	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; PP = presumível positivo.

- ^a 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).
- ^b 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 CERI do ensaio de ligação ao recetor 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/sis/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 deste 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 agonistas⁸

Nº 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) ³	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) 4		
14	Dietilestilbesterol	56-53-1	POS	<1,00 × 10 ⁻¹¹	2,04 × 10 ⁻¹¹	10-14 – 10-8	3,34 × 10 ⁻¹¹	3,73 × 10 ⁻⁴	Hidrocarboneto cíclico	Agente farmacêutico de uso veterinário
12	17α-Estradiol	57-91-0	POS	4,27 × 10 ⁻¹¹	6,44 × 10 ⁻¹⁰	10-11 – 10-5	1,40 × 10 ⁻⁹	3,67 × 10 ⁻³	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
15	meso-Hexesterol	84-16-2	POS	<1,00 × 10 ⁻¹¹	2,75 × 10 ⁻¹¹	10-11 – 10-5	1,65 × 10 ⁻¹¹	3,70 × 10 ⁻³	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
11	4-terc-Octilfenol	140-66-9	POS	1,85 × 10 ⁻⁹	7,37 × 10 ⁻⁸	10-11 – 10-5	3,19 × 10 ⁻⁸	4,85 × 10 ⁻³	Fenol	Produto químico intermédio
9	Genisteína	446-72-0	POS	2,24 × 10 ⁻⁹	2,45 × 10 ⁻⁸	10-11 – 10-5	2,71 × 10 ⁻⁷	3,70 × 10 ⁻⁴	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	2,02 × 10 ⁻⁸	2,94 × 10 ⁻⁷	10-11 – 10-5	5,33 × 10 ⁻⁷	4,38 × 10 ⁻³	Fenol	Produto químico intermédio
2	Campferol	520-18-3	POS	1,36 × 10 ⁻⁷	1,21 × 10 ⁻⁶	10-11 – 10-5	3,99 × 10 ⁻⁶	3,49 × 10 ⁻³	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural
3	Ftalato de butilo	85-68-7	POS	1,14 × 10 ⁻⁶	4,11 × 10 ⁻⁶	10-11 – 10-5	1,98 × 10 ⁻⁶	3,20 × 10 ⁻⁴	Ácido carboxílico, éster, ácido ftálico	Plastificante, Produtos Químicos Industriais
4	p,p'-Metoxicloro	72-43-5	POS	1,23 × 10 ⁻⁶	—	10-11 – 10-5	1,92 × 10 ⁻⁶	2,89 × 10 ⁻³	Hidrocarboneto halogenado	Pesticida, Agente Veterinário
1	Etilparabeno	120-47-8	POS	5,00 × 10 ⁻⁶	—	10-11 – 10-5	2,48 × 10 ⁻⁵	6,02 × 10 ⁻³	Ácido carboxílico, fenol	Produto farmacêutico, conservante
17	Atrazina	1912-24-9	NEG.	—	—	10-10 – 10-4	—	4,64 × 10 ⁻⁴	Composto heterocíclico	Herbicida
20	Espironolactona	52-01-7	NEG.	—	—	10-11 – 10-5	—	2,40 × 10 ⁻³	Lactona, esteroide	Produto farmacêutico
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.

4 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).

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* (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 ^a	N.º CAS	Ensaio ER STTA ¹			Ensaio VM7Luc ER TA ²			Efeitos candidatos ER STTA	CCVAM ⁵ Consensus Classification	Classe de produtos químicos MeSH ⁶	Classe de produtos ⁷
			Atividade ER TA	IC ₅₀ (M)	Gama de concentrações de ensaio (M)	Atividade ER TA	IC ₅₀ ³ (M)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) 4				
1	4-Hidroxióxitamoxifeno	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 moderado	POS	Hidrocarboneto 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 moderado	POS	Hidrocarboneto 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	POS	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico
4	17β-Estradiol	50-28-2	NEG.	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG.	—	$3,67 \times 10^{-3}$	para ser negativa*	PN	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
5	Apigenina	520-36-5	NEG.	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG.	—	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG.	NEG.	Composto heterocíclico	Corante, produto natural, produto farmacêutico intermédio
6	Ftalato de di- <i>n</i> -butilo	84-74-2	NEG.	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG.	—	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG.	NEG.	Éster, ácido ftálico	Ingrediente cosmético, produto químico industrial, plastificante
7	Flavona	525-82-6	NEG.	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG.	—	$4,50 \times 10^{-4}$	para ser negativa*	PN	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
8	Genisteína	446-72-0	NEG.	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG.	—	$3,70 \times 10^{-4}$	para ser negativa*	NEG.	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
9	<i>p</i> - <i>n</i> -Nonilfenol	104-40-5	NEG.	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG.	—	$4,54 \times 10^{-4}$	não ensaiado	NEG.	Fenol	Produto químico intermédio
10	Resveratrol	501-36-0	NEG.	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG.	—	$4,38 \times 10^{-4}$	para ser negativa*	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)

a 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).

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 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).

⁵ 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).

⁶ 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>).

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/sis/htmlgen?HDPB>).

Crêterios 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 PC₅₀ (EC₅₀) ou IC₅₀ (padrões de referência) devem satisfazer os cr terios 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 reproduzibilidade interna do laboratório. Além disso, devem cumprir-se os seguintes princípios relativos aos cr terios 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 cr terios 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 reproduzíveis (por exemplo, os resultados dos dois ensaios indicarem que um produto químico em estudo é positivo), não   necessário realizar uma terceira série de ensaios.
19. Se duas séries de ensaios não permitirem obter resultados reproduzíveis (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.

Crítérios 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., EC₅₀, PC₅₀, IC₅₀) 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, EC₅₀, PC₅₀, RPC_{máx}, IC₅₀, 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 Recetor-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 Recetor 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 Recetor 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 Recetors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: p. 20- 6.
- (10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Recetor 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 Recetor 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 receptors, *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

Critérios 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.

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).

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.

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

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.

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

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.

Produto químico: uma substância ou mistura.

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.

CV: coeficiente de variação

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

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

E2: 17 β -estradiol

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

ED: desregulação do sistema endócrino

hER α : recetor alfa de estrogénio humano

hER β : recetor beta de estrogénio humano

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».

RE: recetor de estrogénio

ERE: elemento de resposta do estrogénio

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. Este método de ensaio permite detetar atividade estrogénica mediada por hER α .

ERTA: transativação do recetor de estrogénio

FBS: soro fetal bovino

HeLa: linha celular imortal do colo do útero humano

HeLa9903: subclone da célula HeLa para a qual foram transfetados de forma estável hER α 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.

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).

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).

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».

MT: metalotioneína

MMTV: vírus do tumor mamário do rato

OHT: 4-hidroxitamoxifeno

PBTG: diretriz de ensaio baseada no desempenho

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.

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).

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.

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

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

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.

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

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).

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.

RLU: unidades de luz relativas

ARN: ácido ribonucleico

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

RPMI: meio RPMI 1640 complementado com 0,9 % de «pen-strep» e 8,0 % de soro fetal bovino (FBS)

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.

DP: desvio-padrão.

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).

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).

Transfecção estável: quando o ADN é transferido para células de cultura de modo a ser estavelmente 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).

Ensaio STTA: ensaio de transativação transfetada de forma estável, o ensaio de ativação transcricional ER α com recurso à linha celular HeLa 9903.

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.

Substância: nos termos do REACH¹¹, 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).

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

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.

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

Transcrição: síntese do mARN

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

¹¹ 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).

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).

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.

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.

Apêndice 2

RECETOR 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-9903 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-9903 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-9903, que é derivada de um tumor do colo do útero humano, com dois elementos estavelmente inseridos: (i) o elemento de expressão hER α (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-9903 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-9903 transfetada de modo estável. A linha celular pode ser obtida na Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank¹², 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

¹² JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan. Fax: +81-72-641-9812

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±1 °C. Quando atingem uma confluência de 75-90%, as células podem ser subcultivadas em 10 ml de 0,4 × 10⁵ – 1 × 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 × 10⁴ células/(100 µl × poço). Em seguida, as células devem ser pré-incubadas numa incubadora com 5 % de CO₂ a 37±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 hERα-HeLa-9903, 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.

CrITÉRIOS 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 (17α-estradiol), um agonista muito fraco (17α-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 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 avaliados corretamente, 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: 10540-29-1	Positivos: O IC ₅₀ deve ser calculado	-5,942~-7,596	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M

Flutamida N.º CAS: 13311-84-7	Negativos: O IC ₃₀ não deve ser calculado	-	10-10~10-5M

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 1µM 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 sigmoidal 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 uma concentração 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 10⁴ 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: Controle do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controle positivo (1 nM E2)

27. Os padrões de referência (E2, 17α-estradiol, 17α-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 controle 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 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	Conc. 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Conc. 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Conc. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	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: Controle do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controle 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 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	conc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
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 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controle do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controle 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 de controlo da qualidade da linha celular hER α -HeLa-9903, 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 µM OHT e os poços tratados com 100 µM 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 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	Conc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
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 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veículo (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 ±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):

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / \{1 + 10^{[\log(\text{EC}_{50}) - X] \times \text{curva de Hill}}\}$$
, 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

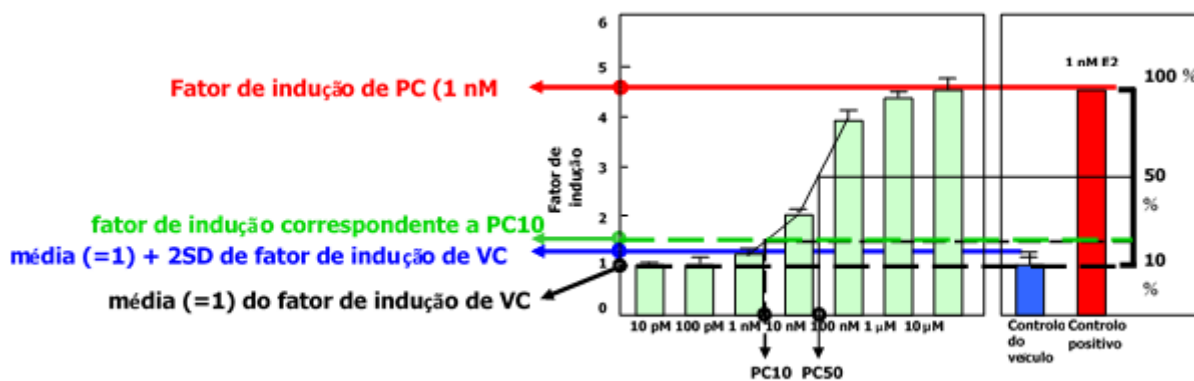
No caso de produtos químicos positivos, as concentrações que induzem o PC₁₀ e, se for caso disso, o PC₅₀.

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.

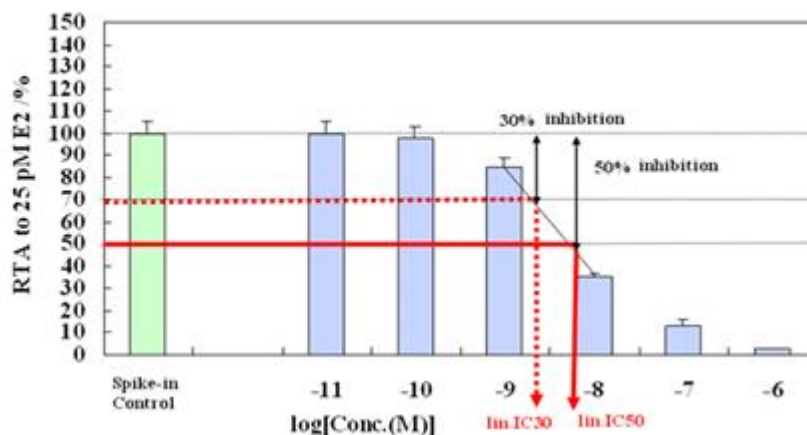
Considerações de indução de IC₃₀ e IC₅₀

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:

$$\ln IC_x = a - [b - (100 - x)] (a - c) / (b - d)$$

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 comparáveis 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.

Critérios de interpretação dos dados

Quadro 7: Critérios de decisão positiva e negativa no ensaio de agonistas do ER

Positiva	Se o $RPC_{m\acute{a}x}$ 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 $RPC_{m\acute{a}x}$ não atingir, pelo menos, 10 % da resposta do controlo positivo em duas de duas ou duas de três séries de ensaios.

Quadro 8: Critérios 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 critérios de interpretação dos dados constam dos quadros 7 e 8. Os resultados positivos serão caracterizados pela magnitude do efeito e pela concentração a que o efeito ocorre. Se os resultados forem expressos como uma concentração à qual se obtêm os valores de 50 % (PC_{50}) ou 10 % (PC_{10}) de PC, para o ensaio de agonistas, e 50 % (IC_{50}) ou 30 % (IC_{30}) dos valores de inibição do pico de controlo, para o ensaio de antagonistas, estão cumpridos ambos os objetivos. No entanto, um produto químico em estudo é considerado positivo se a resposta máxima induzida pelo produto químico em estudo ($RPC_{m\acute{a}x}$) 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 $RCP_{m\acute{a}x}$ 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 PC_{10} , PC_{50} e $PC_{m\acute{a}x}$ no ensaio de agonistas do ER e de IC_{30} e IC_{50} 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 OCDE¹.
45. Essa folha de cálculo deve ser suficiente para obter os valores de PC_{10} ou PC_{50} e de IC_{30} ou IC_{50} pelo menos duas vezes. Porém, se os dados de base resultantes para o mesmo intervalo de concentração mostrarem variabilidade com um coeficiente de variação (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 à intensidade de luminescência) dos pontos utilizados para o cálculo do PC_{10} deve ser inferior a 20 %.
46. O cumprimento dos critérios de aceitabilidade indica que o sistema de ensaio está a funcionar corretamente, mas não assegura que uma determinada operação produza dados exatos. A duplicação dos resultados da primeira série de ensaios é a melhor garantia de que foram produzidos dados exatos.
47. No caso do ensaio de agonistas do ER, em que são necessárias mais informações para além dos fins de monitorização e priorização da presente *Test Guideline* para produtos químicos positivos, especialmente para produtos químicos PC_{10} - PC_{49} , bem como para produtos químicos suspeitos de estimular excessivamente a luciferase, pode confirmar-se que a atividade da luciferase observada é unicamente uma resposta específica do antagonista do ER α , utilizando um antagonista do ER α (ver apêndice 2.1).

RELATÓRIO DO ENSAIO

48. Ver ponto 20 dos «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA».

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

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, 1459-1469.
- (3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Recetor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (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 182780 pode não ser adequado para este efeito, uma vez que uma concentração suficiente de ICI 182780 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 estrogênicos do soro que é adicionado ao meio celular, a fim de excluir a resposta distorcida associada aos estrogênios 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 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

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); centrífugadora 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. Suspende 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 RECETOR DE ESTROGÉNIO VM7LUC PARA IDENTIFICAR OS AGONISTAS E OS ANTAGONISTAS DO RECETOR DE ESTROGÉNIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. O presente ensaio utiliza a linha celular VM7Luc4E2¹. 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 (10). 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 (10).

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.

Além disso, em alguns ensaios de genes repórteres do ER baseados na luciferase, foram comunicados sinais de luminescência não mediados por recetores em concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 µM, devido à sobreativação do gene repórter da luciferase (9) (11). 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 (see Appendix 2).

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 recetor-ligando ao núcleo. No núcleo, o complexo recetor-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 constituinte 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, EUA¹, e da Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, EUA².

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 ±1 °C, 90 % ±5 % de humidade e 5,0 % ±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)].

Critérios 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

¹ 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

² 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

padrão de referência é ensaiado em várias concentrações, havendo várias amostras de cada concentração de referência e de controlo. Os resultados são comparados 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 sigmoide 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 sigmoidal 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 completo

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 EC₅₀ /IC₅₀

34. Os valores EC₅₀ (metade da concentração efetiva máxima de um produto químico em estudo [agonistas]) e IC₅₀ (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 (IC₅₀ ou EC₅₀) 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;

Log(EC₅₀) [ou log(IC₅₀)] = 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 IC₅₀ e EC₅₀. Para o cálculo dos valores de EC₅₀ e IC₅₀, 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 caráter 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 EC₅₀ 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 IC₅₀ 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 EC₅₀ 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 IC₅₀ 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.

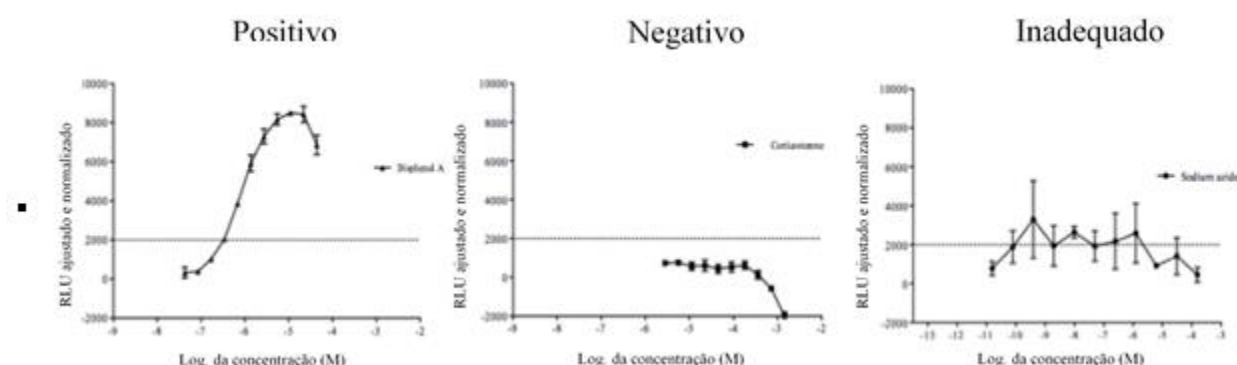
Quadro 1: Critérios de decisão positivos e negativos

ATIVIDADE AGONISTA	
Positiva	- 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 ($DP \pm \text{média}$). 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., 2 000 RLU ou mais, se o valor máximo de resposta dos padrões de referência [E2] for ajustado para 10 000 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	- 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 registrar-se, pelo menos, uma redução de 20 % na atividade do valor máximo do padrão de referência Ral/E2 (i.e., 8 000 RLU ou menos, quando o valor máximo da resposta do padrão de referência [Ral/E2] é ajustado para 10 000 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 ED_{80} (80 % da resposta de E2 ou 8 000 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.

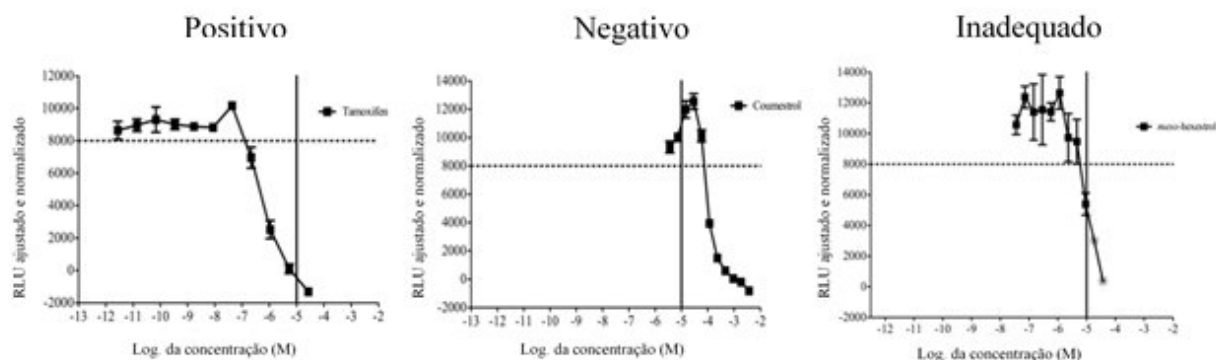
40. Sempre que possível, os resultados positivos serão caracterizados pela magnitude do efeito e pela concentração a que este ocorre. Nas figuras 5 e 6, apresentam-se exemplos de dados positivos, negativos e inadequados.

Figura 5: Exemplos de agonistas: Dados positivos, negativos e inadequados



A linha a tracejado indica 20 % da resposta do E2, 2 000 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, 8 000 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 8 000 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 8 000 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 Recetor 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 Recetor-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 Recetor (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 Recetor 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 Recetor 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) (11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Recetor Beta, *Endocrinology*,139(10):4252-63.
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone recetors, *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 estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

APÊNDICE 4

ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO DE RECETOR- α DE ESTROGÊNIO HUMANO ESTAVELMENTE TRANSFETADO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA AGONISTA E ANTAGONISTA NOS PRODUTOS QUÍMICOS COM RECURSO À LINHA CELULAR ERA 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 recetor 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 o 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 recetor (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 recetor-ligando para o núcleo. No núcleo, o complexo recetor-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 completos. 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.
8. 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

9. 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.
10. 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

11. 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.
12. 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 ERα 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

13. 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 1×10^5 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 µl 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.

Critérios de aceitabilidade

14. 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 sigmoideal 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	1,0*10 ⁻¹³ - 1,0*10 ⁻¹⁰
Controlo positivo (PC)	17 α -Metiltestosterona	58-18-4	3,0*10 ⁻⁰⁶
Controlo negativo (NC)	Corticosterona	50-22-6	1,0*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	3,0*10 ⁻⁰⁹ - 1,0*10 ⁻⁰⁵
Controlo positivo (PC)	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	1,0*10 ⁻⁰⁹
Controlo negativo (NC)	Resveratrol	501-36-0	1,0*10 ⁻⁰⁵

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; placa 1)	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 (17β-estradiol)

8	Gama EC ₅₀ para o padrão de referência (17β-estradiol)	4*10 ⁻¹² – 4*10 ⁻¹¹ M
9	Fator de indução mínimo da concentração mais elevada de 17β-estradiol, em relação ao controle de solvente do padrão de referência.	5
10	(%) PC indução relativa.	> 30 %
11	(%) NC indução relativa	< 10 %

Aprox.: aproximado; PC: controle positivo; NC: controle negativo; SC: controle de solvente do produto químico em estudo; C0: controle de solvente do padrão de referência; DP: desvio-padrão; DHL: desidrogenase láctica

Quadro 4: Critérios de aceitação para o bioensaio antagonístico ERα 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 controle do solvente (C0) do padrão de referência)	< 15 %
2	% DP máximo dos poços triplicados (para o controle 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 controle de solvente do padrão de referência mais elevadas e o controle 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 ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$, $1,0 \cdot 10^{-10}$ 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 ($3,0 \cdot 10^{-09}$, $1,0 \cdot 10^{-08}$, $3,0 \cdot 10^{-08}$, $1,0 \cdot 10^{-07}$, $3,0 \cdot 10^{-07}$, $1,0 \cdot 10^{-06}$, $3,0 \cdot 10^{-06}$, $1,0 \cdot 10^{-05}$ M). Cada uma das concentrações do padrão de referência antagonístico é coincubada com uma concentração fixa do padrão de referência agonístico 17 β -estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Controlo positivo

28. No caso de estudos agonísticos, o controlo positivo é 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, 17β -estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ 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, 17β -estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ 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 pormenorizada 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×, 1 000× e 3 000×.

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 ER α 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 μ l de células ressuspensas nos poços interiores de uma placa de microtitulação com 96 poços. Os poços exteriores são preenchidos com 200 μ l 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 μ l 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),

contêm igualmente uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17 β -estradiol (3,0*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 CO₂ (5% CO₂, 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 μ l 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-	TC1-	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 17β-estradiol).

Células cinzentas: = Poços exteriores, preenchidos com 200 µl 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, 17β-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 seleccionar-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 seleccionada.
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 seleccionar-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 seleccionada.
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 ensaio completas, 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, controles e produtos químicos em estudo utilizados nos ensaios agonistas

17 β -estradiol de referência conc. (M)		TCx - série de ensaios de avaliação prévia diluição		TCx - série de ensaios completos diluição		Controles conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3,0*10 ⁻⁰⁶
C1	1,0*10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1,0*10 ⁻⁰⁸
C2	3,0*10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1,0*10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3,0*10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6,0*10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1,0*10 ⁻¹⁰						

TCx - Produto químico em estudo x

PC - Controlo positivo (17 α -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, controles e produtos químicos em estudo utilizados nos ensaios antagonistas

Tamoxifeno de referência conc. (M)		TCx - série de ensaios de avaliação prévia diluição		TCx - série de ensaios completos diluição		Controles conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	1,0*10 ⁻⁰⁹
C1	3,0*10 ⁻⁰⁹	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1,0*10 ⁻⁰⁵
C2	1,0*10 ⁻⁰⁸	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3,0*10 ⁻⁰⁸	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1,0*10 ⁻⁰⁷	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	3,0*10 ⁻⁰⁷	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	Agonista complementado conc. (M)	
C6	1,0*10 ⁻⁰⁶	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻⁰⁶	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β -estradiol	3,0*10 ⁻¹²
C8	1,0*10 ⁻⁰⁵						

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, 17 β -estradiol (3,0*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 EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ 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 IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ e de indução mínima (TCx_{min}). 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:

$$Y = Base + \frac{(Topo - Base)}{(1 + 10^{((\log EC_{50} - X) * Declive)})}$$

em que:

X = Log de dose ou concentração

Y = Resposta [(%) indução relativa]

Topo = (%) indução máxima

Base = (%) indução mínima

Log(EC₅₀) = Log da concentração à qual se observam 50 % da resposta máxima

Curva de Hill = 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:

Agonistismo

- Subtrair a RLU média do controlo do solvente do padrão referência de cada um dos dados brutos de análise dos padrões de referência.

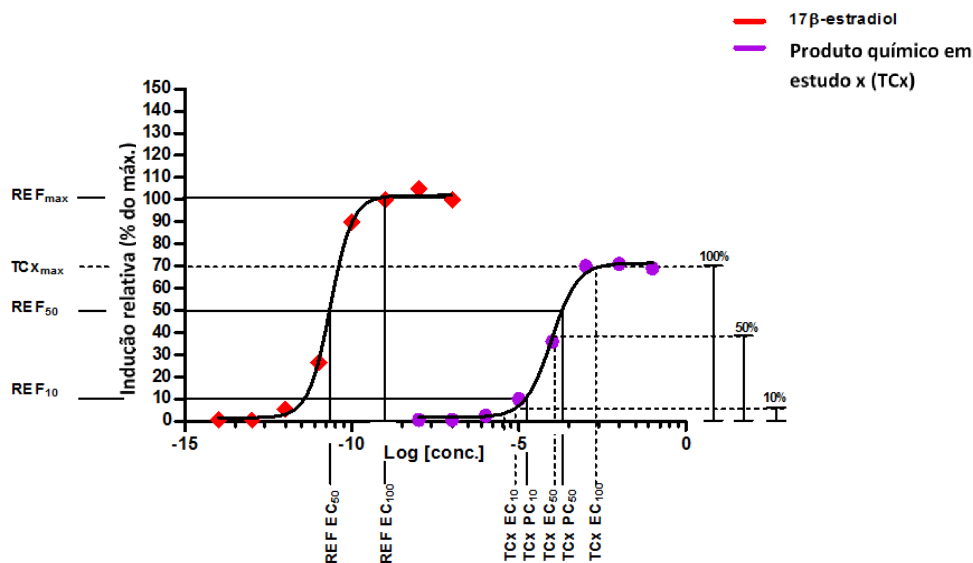
- Subtrair a RLU média para o controlo do solvente do produto químico em estudo de cada um dos dados de análise brutos dos produtos químicos em estudo.
- Calcular a indução relativa de cada concentração do padrão de referência. Fixar a indução da mais elevada concentração do padrão de referência em 100 %.
- 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



EC₁₀ = Concentração de uma substância em que se observam 10 % da sua resposta máxima.

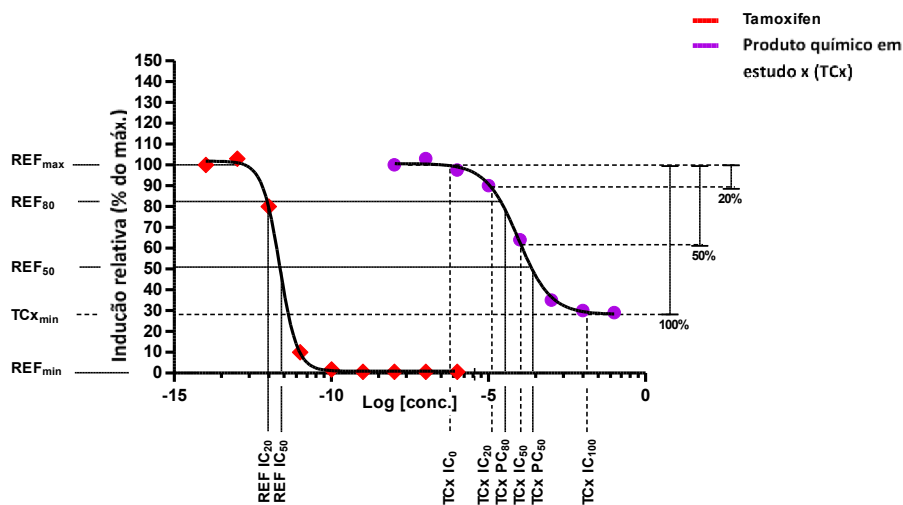
EC₅₀ = Concentração de uma substância em que se observam 50 % da sua resposta máxima.

PC₁₀ = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual a EC₁₀ do padrão de referência.

PC₅₀ = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à EC₅₀ do padrão de referência.

TCx_{máx} = Indução máxima relativa do produto químico em estudo.

Figura 4: Panorâmica dos parâmetros determinados no ensaio de antagonistas



IC₂₀ = Concentração de uma substância em que se observa 80 % da sua resposta máxima (20 % de inibição).

IC₅₀ = Concentração de uma substância em que se observa 50 % da sua resposta máxima (50 % de inibição).

PC₈₀ = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à IC₂₀ do padrão de referência.

PC₅₀ = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à IC₅₀ 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 IC₅₀, o IC₂₀ e o PC₅₀. Nesse caso, só o PC₂₀ 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, reproduzíveis, 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 reproduzíveis.

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»

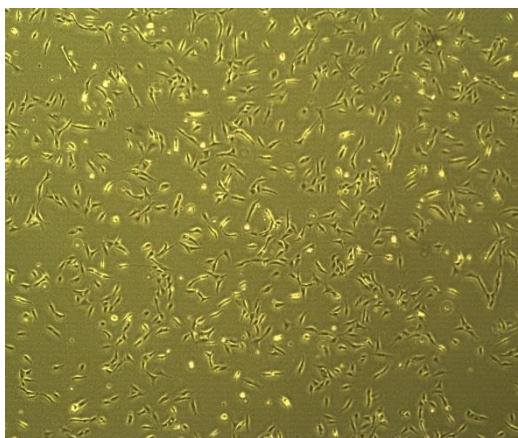
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (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, Cavaillès 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

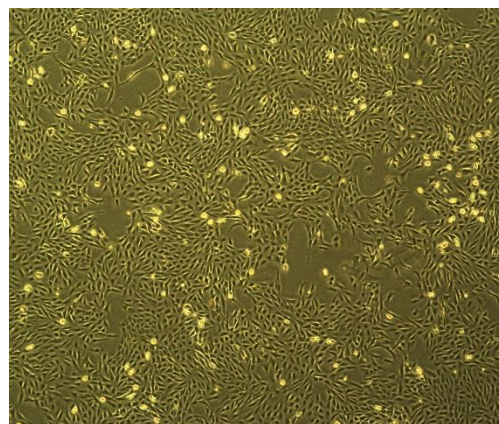
contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.

- (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

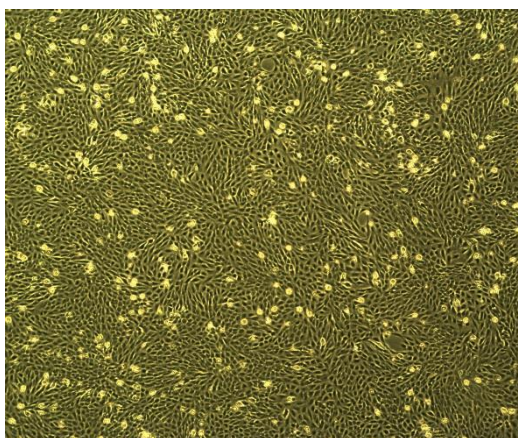


Confluência < 5 %. As células acabaram de ser
semeadas. Viabilidade celular: 100 %.
Classificação: «sem citotoxicidade»



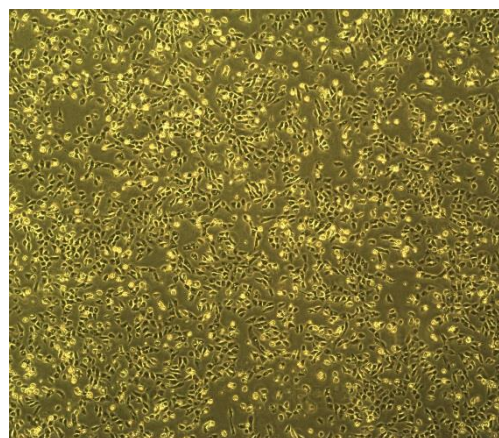
Confluência > 85 %. Nesta fase, as células são
expostas aos produtos químicos em estudo.
viabilidade celular > 95 %.

Classificação: «sem citotoxicidade»

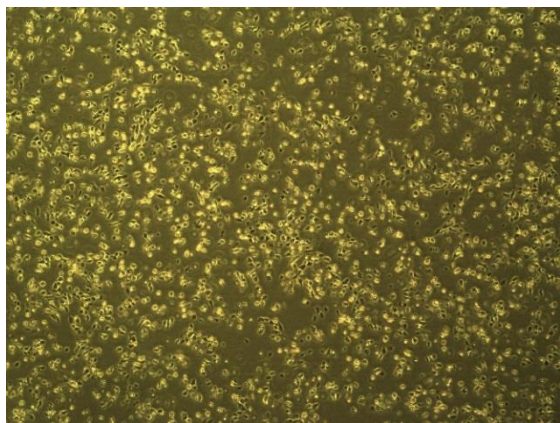


Confluência > 95 %. A cultura de células é muito
densa e começam a crescer demasiado. Viabilidade
celular > 95 %.

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* no presente método de ensaio). Este 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 autossômica e heterozigótica do gene da timidina-cinase permite detetar colônias 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 cromossômicos (supressão de grandes sequências e rearranjos cromossômicos, recombinação mitótica). Estes últimos são expressos em perdas de heterozigosidade, que é uma mudança genética comum de genes supressores tumorais na tumorigênese 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. A *Test Guideline* para o método de ensaio está estruturada 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 seleccionar células deficientes em TK e adicionar à cultura timidina, hipoxantina e glicina (L5178Y) ou 2'-desoxicitidina (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, ratazanas) 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

20. 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

21. 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. 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

22. 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.
23. 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).
24. 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.
25. 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 positivo 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 cromossômicos (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 × 10 ⁻⁶	50 – 170 × 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 (TFTr) 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., Jraynak, 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 McCooey 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

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.

Mutagénios por substituição de um par de bases: Produtos químicos que causam a substituição de pares de bases do ADN.

Produto químico: uma substância ou mistura.

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

Clastogénio: Produto ou processo químico que provoca aberrações cromossómicas estruturais em populações de células ou organismos.

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.

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.

Mutagénios 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.

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.

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.

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

Frequência de mutação (MF): Relação entre o número de células mutantes observadas

e o número de células viáveis.

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 caráter fenotípico.

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 controle negativo.

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 controle negativo/de solvente em dois dias (Clive e Spector, 1975). O RSG deve incluir o crescimento relativo da cultura de ensaio em relação ao controle 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 controle 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 controle negativa/solvente (Clive e Spector, 1975).

Frações de fígado S9: Sobrenadante após centrifugação a 9 000 g do homogeneizado hepático (extrato de fígado em bruto)

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

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 registrado 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.

Controle do solvente: Termo geral que define as culturas de controle tratadas apenas com o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo.

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

Amostra de controle 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.

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 (SG₁) 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 (SG₂) 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 (SG₁ × SG₂) 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 SG₁ deve ser calculado a partir da concentração inicial de células utilizada no início do tratamento celular. Contabiliza 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 ao *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

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).

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 tensioativos) 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 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, excetuando-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» é utilizada neste método de ensaio para referir o produto que está a ser estudado¹¹, 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 Serum Institut 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

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.

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 benzalcónio (10 % aquoso)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquido	Categoria 1	Salino	Categoria 1
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
Sulfato de <i>N,N</i> -dimetilguanidina	598-65-2	Amidina; composto de enxofre	Sólido	Nenhuma categoria	Salino	Nenhuma categoria

Abreviaturas: N.º de registo CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

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 NIECEATM.

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).

PROCEDIMENTO

Preparação da monocamada celular

15. 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.
16. 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.
17. 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 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.

$$Viabil. cel. (\%) = \frac{(DO_{570} prod. qu\acute{m}. estudo) - (DO_{570} de vazio)}{(DO_{570} do controlo do solvente) - (DO_{570} de vazio)} \times 100$$

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 tensioativos e das misturas constituídas apenas por tensioativos
≤ 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.1855-1869.
- (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.* 1648-1653.
- (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

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).

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.

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).

Produto químico: Uma substância ou mistura.

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.

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.

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.

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.

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

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

MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]; brometo de tiazolilo; azul de tetrazólio.

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração $\geq 10\%$ (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.

DO: Densidade ótica.

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.

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).

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).

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).

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.

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.

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).

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.

Agente tensioativo: 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».

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

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.

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).

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).

Categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «Lesão ocular grave».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «irritação ocular».

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.

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).

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).

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 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 Toolbax 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 neste método de ensaio para referir o que é objeto do estudo¹, 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 morfologicamente 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 tensioativos e solventes orgânicos), coagulação macromolecular (sobretudo proteínas) (por exemplo, tensioativos, 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 mecanístico 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

¹ 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.

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.

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™¹, e > 50 %, no caso do HCE EITS da SkinEthic™²) (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

¹ EITL: EIT para líquidos, no caso do HCE da SkinEthic™

² EITS: EIT para sólidos no caso do HCE da SkinEthic™

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 reprodutíveis em métodos de ensaio RhCE durante as respectivas validações; (ix) foram corretamente preditos por métodos de ensaio RhCE durante os respectivos 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 <i>in vivo</i>1⁴								
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 hidroexitilo	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 <i>in vivo</i>2A⁴								
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)
Benzoato de sódio	532-32-1	Arilo; ácido carboxílico	S	3,5 ±2,6	0,6 ±0,1	Previsão impossível	N	N
Categoria <i>in vivo</i> 2B⁴								
Dietiltoluamida	134-62-3	Benzamida	L	15,6 ±6,3	2,8 ±0,9	Previsão impossível	N	N
2,2-Dimetil-3-metilenobiciclo [2.2.1]heptano	79-92-5	Alcano ramificado com carbono terciário; alceno; biciclo-heptano; carbociclo de anel em ponte; carbociclo cicloalcano	S	4,7 ±1,5	15,8 ±1,1	Previsão impossível	N	N
Nenhuma categoria <i>in vivo</i>⁴								
Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazólio	342573-75-5	Alcóxido; sal de amônio; 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

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
Butóxido de piperonilo	51-03-6	Alcoxi; benzodioxole; benzilo; éter	L	104,2 ±4,2	96,5 ±3,5	Nenhuma cat.	N	N
Polietilenoglicol (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
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 tópica 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)	$> 1,0$	$\leq 2,5$

¹Este 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 EF_{50} (Triton X-100) ou pela IC_{50} (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 ET_{50} ou IC_{50} (ver pontos 25 e 26). A gama de aceitabilidade do ET_{50} e IC_{50} , 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	$ET_{50} = 12,2 \text{ min}$	$ET_{50} = 37,5 \text{ min}$

(100 µl de Triton X-100 a 0,3% (v/v))		
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 controle

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 controle. 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 umidade do olho humano. O tratamento dos tecidos é iniciado com a exposição ao(s) produto(s) químico(s) em estudo e às substâncias de controle. Para ambos os protocolos de tratamento de ambos os VRM, aplica-se uma quantidade suficiente do produto químico em estudo ou da substância de controle 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 controle, 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 Ca²⁺/Mg²⁺, 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 devem 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.

CrITÉRIOS 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 $\leq 30 \%$ (protocolo para líquidos) ou $\leq 20 \%$ (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 o protocolo dos líquidos)	Viabilidade média dos tecidos > 60 %	Viabilidade média dos tecidos ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (para o protocolo relativo aos 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 $60 \pm 5\%$ (VRM1 e VRM2, no caso do protocolo para líquidos) ou $50 \pm 5\%$ (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) Kolle, 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: Dermatoxicology* 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: [\[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index\]](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

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).

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.

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).

Produto químico: Uma substância ou mistura.

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.

EIT: Ensaio de irritação ocular.

EURL ECVAM: Laboratório de referência da União Europeia para as alternativas à experimentação animal.

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.

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.

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.

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.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

HPLC: Cromatografia líquida de alta resolução

IC₅₀: Concentração à qual o produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 %, após um período de exposição fixo (por exemplo: 30 minutos de tratamento com SDS).

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».

LLOQ: Limite de quantificação inferior.

Log(P): Logaritmo do coeficiente de repartição octanol/água.

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

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.

MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]; brometo de tiazolilo; azul de tetrazólio.

Amostra de controlo negativa: 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 %.

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.

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

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

NSMTT: Redução não específica do MTT.

DO: Densidade ótica.

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).

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.

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).

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).

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).

Reprodutibilidade: Acordo entre resultados obtidos em ensaios com o mesmo produto químico, utilizando o mesmo protocolo de ensaio (ver «Fiabilidade») (18).

Efeitos oculares reversíveis: Ver «irritação ocular».

RhCE: Epitélio corneano humano reconstruído

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.

DP: Desvio-padrão.

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).

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.

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.

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).

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.

Ensaio: Um único produto químico em estudo ensaiado em paralelo com, pelo menos, dois tecidos replicados, como definido no PON correspondente.

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.

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).

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

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).

ULOQ: Limite de quantificação superior.

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).

Categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «Lesões oculares graves».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «irritação ocular».

«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.

UPLC: Cromatografia líquida de alta resolução.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou matérias biológicas.

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).

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».

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.

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)	
	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)
Protocolos				
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

Componentes do ensaio	<EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Controlo prévio de interferência cromática	50 µl + 1 ml H₂O durante 60 min a 37±2°C, 5±1% CO₂, ≥ 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 densidade ótica do isopropanol ou da água, 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 H₂O durante 60 min a 37±2°C, 5±1% CO₂, ≥ 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 H₂O 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 H₂O 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>

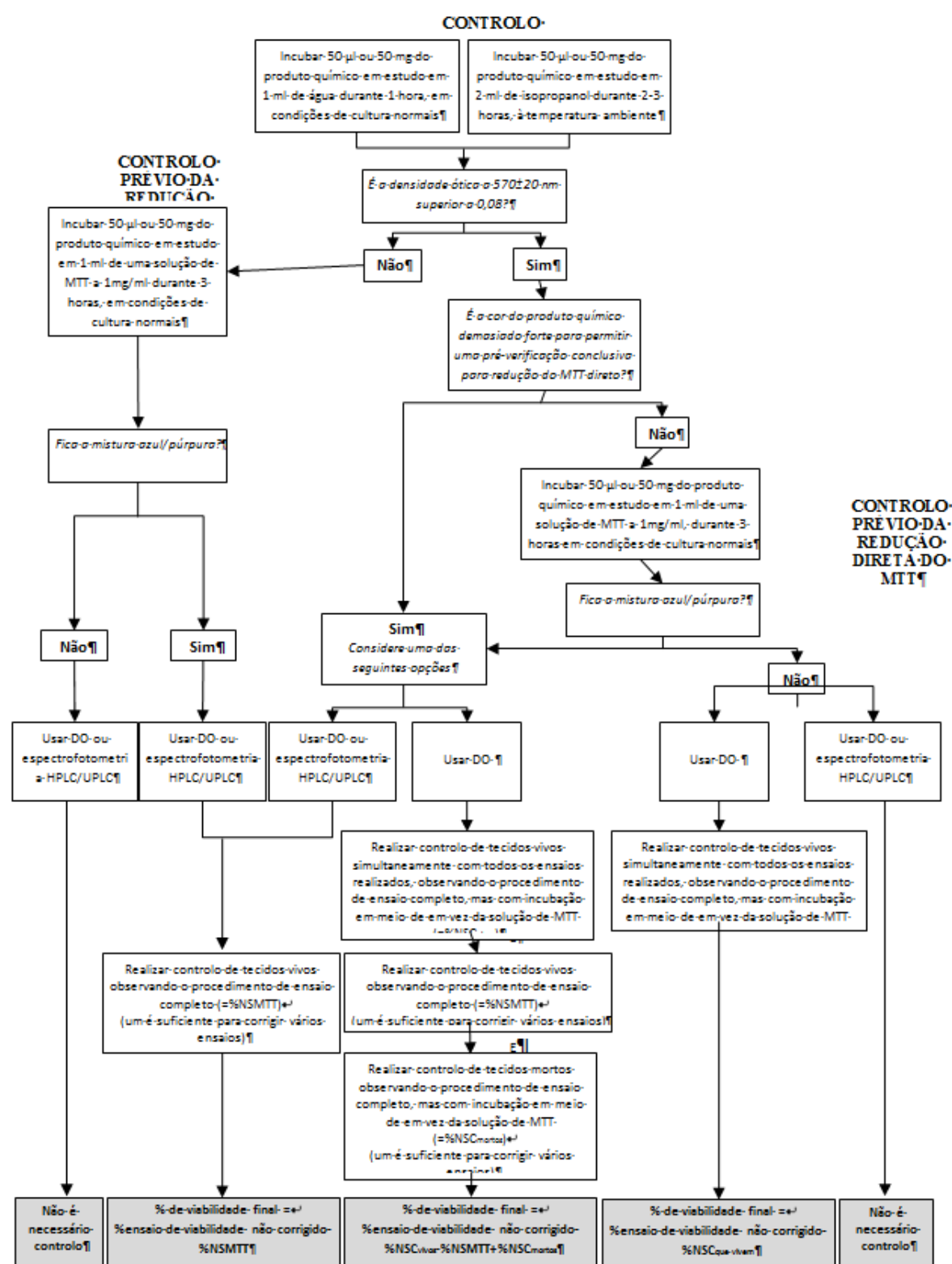
Componentes do ensaio	<EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Controlo prévio da redução direta do MTT	50 µl+1 ml de MTT 1 mg/ml de solução durante 180±15 min a 37±2 °C, 5±1 % de CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa → se a solução ficar de cor azul/púrpura, devem realizar-se controlos 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).	30 mg +300 µl de MTT S1 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 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).	10 µl de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) Para produtos viscosos, utilizar uma malha de <i>nylon</i>	30 µl de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
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	30 min (± 2 min) 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
Lavagem temperatura ambiente à	3 vezes em 100 ml de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺	3 vezes em 100 ml de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺	20 ml de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺	25 ml de DPSB sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺

Componentes do ensaio		<EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 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 (± 0,25 h) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa	nenhuma	18 h (± 0,5 h) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % CO ₂ , ≥ 95 % de humidade relativa
Controlo negativo		50 µl H ₂ O Ensaio paralelo	50 µl H ₂ O Ensaio paralelo	30 ±2µl de DPBS sem Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Ensaio paralelo	30 ±2µl de DPBS sem Ca ²⁺ /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
Solução de MTT		300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	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	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 solvente	do	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)	1,5 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção)	1,5 ml de isopropanol (extração do fundo da inserção)
Tempo temperatura extração	e de	2-3 horas com agitação (~20 rpm) à temperatura ambiente ou de um dia para o outro a 4-10 °C	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	Pelo menos 2 horas com agitação (~120 rpm), à temperatura ambiente
Leitura densidade ótica	da	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	570 nm (540 - 600 nm) sem filtro de referência	570 nm (540 - 600 nm) sem filtro de referência
Controlo qualidade tecidos	da dos	Tratamento com 100 µl de Triton X-100 a 0,3 % 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	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	30 minutos de tratamento com SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Componentes do ensaio		<EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Critérios aceitação	de	1. A densidade média dos replicados tratados com o controlo negativo deve ser $> 0,8$ e $< 2,5$ 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 %. 3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.	1. A densidade média dos replicados tratados com o controlo negativo deve ser $> 0,8$ e $< 2,5$ 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 6 horas com o controlo positivo, expressa em % da amostra de controlo negativa, deve ser < 50 %. 3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.	1. A densidade média dos replicados tratados com o controlo negativo deve ser $> 1,0$ e $\leq 2,5$ 2. A viabilidade média dos replicados de tecidos expostos durante 30 minutos com o controlo positivo, expressa em % do controlo negativo, deve ser ≤ 30 % 3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.	1. A densidade média dos tecidos replicados tratados com o controlo negativo deve ser $> 1,0$ e $\leq 2,5$ 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 4 horas com o controlo positivo, expressa em % do controlo negativo, deve ser ≤ 20 % 3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.

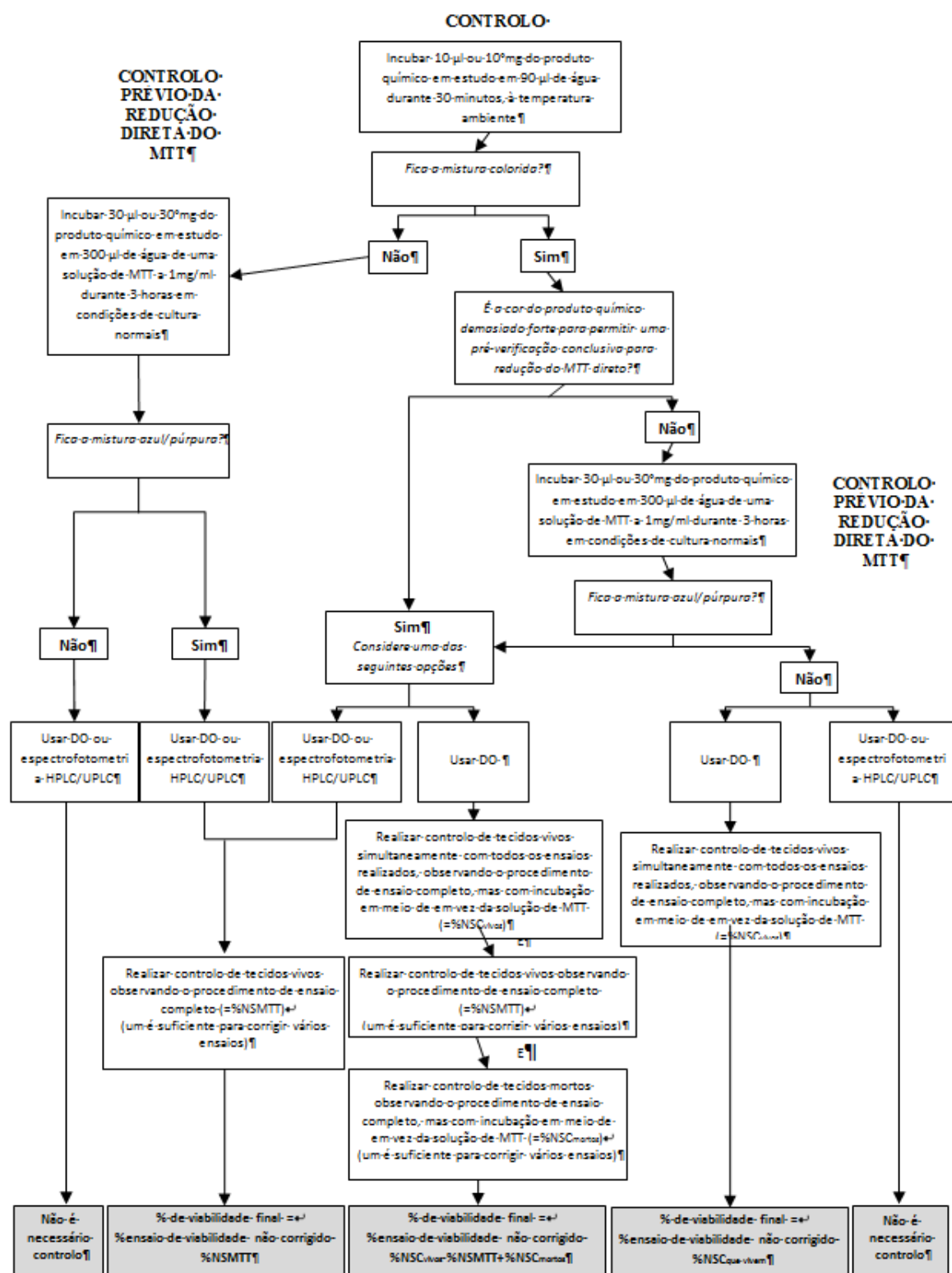
Apêndice 3

FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DE ORIENTAÇÃO PARA IDENTIFICAR E MANUSEAR OS REDUTORES DIRETOS DO MTT E/OU OS PRODUTOS QUÍMICOS INTERFERENTES CROMÁTICOS COM BASE NOS PONTO 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 PONTO 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)	$\text{Área}_{\text{interferência}} \leq 20 \% \text{ da } \text{Área}_{\text{LLOQ}}^1$
Precisão	Controlos de qualidade (MTT formazano a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) em isopropanol (n = 5)	CV $\leq 15\%$ or $\leq 20\%$ para o LLOQ
Exatidão	Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	% Dev $\leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ para LLOQ
Efeito matriz	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 5)	$85\% \leq \% \text{ efeito de matriz} \leq 115\%$
Passagem	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ ²	$\text{Área}_{\text{interferência}} \leq 20 \% \text{ da } \text{Área}_{\text{LLOQ}}$
Reprodutibilidade (intradiária)	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 $\leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ para LLOQ Controlos de qualidade: % Dev $\leq 15\%$ e CV $\leq 15\%$
Reprodutibilidade (intradiária)	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 RhCE	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisados no dia da preparação e após 24 horas de armazenagem à temperatura ambiente.	% Dev $\leq 15\%$
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 $\leq 15\%$

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 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 DETECÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS COM AFINIDADE LIGANTE COM O ER

INTRODUÇÃO GERAL

Método de ensaio baseado na *Test Guideline* da OCDE

1. Este método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 493 (2015) da OCDE. O *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 detecção 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 PBTM 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 seleccionados. 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 CERI 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 tensioativos 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	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ligante	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
2	Noretinodrel	68-23-5	Ligante	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligante	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligante	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
3	Norentindrona	68-22-4	Ligante	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligante	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligante	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
4	Ftalato de di- <i>n</i> -butilo	84-74-2	Não ligante*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Não ligando	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Não ligando	Hidrocarboneto cíclico, éster	Plastificante, Produto químico intermédio
5	DES	56-53-1	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
6	17α-Etinilestradiol	57-63-6	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
7	Meso-hexesterol	84-16-2	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
8	Genisteína	446-72-0	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Hidrocarboneto heterocíclico, flavonoide	Produto natural
9	Equol	531-95-3	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Fitoestrogénio Metabolito	Produto natural
10	Butilparabeno (4-hidroxibenzoato de <i>n</i> -butilo)	94-26-8	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Parabeno	Conservante
11	Nonilfenol (mistura)	84852-15-3	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Alquilfenol	Composto intermédio
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Organoclorado	Inseticida
13	Corticosterona	50-22-6	Não ligante*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Não ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Não ligante	Esteróide	Produto natural
14	Zearalenona	17924-92-4	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Hidrocarboneto heterocíclico, lactona	Produto natural
15	Tamoxifeno	10540-29-1	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico, agente veterinário
16	5α-Di-hidrotestosterona	521-18-6	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Esteróide não fenólico	Produto natural
17	Bisfenol A	80-05-7	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Fenol	Produto químico intermédio
18	4- <i>n</i> -Heptilfenol	1987-50-4	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Equívoco ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Alquilfenol	Intermédio
19	Kepone (Clordecona)	143-50-0	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Hidrocarboneto halogenado	Pesticida

20	Benzo(a)antraceno	56-55-3	<i>Não ligante</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Não ligante ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Não ligante ^b	Hidrocarboneto aromático	Intermédio
21	Enterolactona	78473-71-9	<i>Ligante</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligante	Fitoestrogénio	Produto natural
22	Progesterona	57-83-0	<i>Não ligante*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Não ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Não ligante	Esteroide	Produto natural
23	Octiltrietoxissilano	2943-75-1	<i>Não ligante</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Não ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Não ligante	Silano	Modificador de superfície
24	Atrazina	1912-24-9	<i>Não ligante*</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Não ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Não ligante	Composto heterocíclico	Herbicida

* Limite de solubilidade $< 1 \times 10^{-4}$ M.

* A utilização e classificação de ftalato 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 ftalato 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 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.

^b 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 intervalidação. Assim, a classificação correta para esta substância é «não ligante» quando é utilizado nas condições experimentais dos ensaios de FW e do CERIT.

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 IC_{50}), 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 hrER¹

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	17 β -Estradiol	50-28-2	Ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
2	Noretinodrel (ou) Norentinodrona	68-23-5 (ou) 68-22-4	Ligante	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
3	Octiltrietoxissilano	2943-75-1	Não ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silano	Modificador de superfície
Substâncias para a demonstração de competência técnica⁶						
4	Dietilestilbestrol	56-53-1	Ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
5	17 α -Ethinilestradiol	57-63-6	Ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Esteróide	Produto farmacêutico, agente veterinário
6	Meso-hexesterol	84-16-2	Ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
7	Tamoxifeno	10540-29-1	Ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico, agente veterinário
8	Genisteína	446-72-0	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Composto heterocíclico, flavonoide	Produto natural
9	Bisfenol A	80-05-7	Ligante	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Produto químico intermédio
10	Zearalenona	17924-92-4	Ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Composto heterocíclico, lactona	Produto natural

11	Butilparabeno	94-26-8	Ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Ácido carboxílico, fenol	Conservante
12	Atrazina	1912-24-9	Não ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Composto heterocíclico	Herbicida
13	Ftalato de di- <i>n</i> -butilo (DBP) ⁷	84-74-2	Não ligante ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Hidrocarboneto cíclico, éster	Plastificante, Produto químico intermédio
14	Corticosterona	50-22-6	Não ligante	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	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 ER α 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 (10) (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 DPB pode ser utilizado como não ligante de controlo alternativo 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 CERI 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 $B_{\text{máx}}$ 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., $\log(IC_{50})$, 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 Recetor 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 Recetor 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 Recetors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.
- (6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Recetor 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 Recetor 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 Recetor 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 Recetor and Androgen Recetor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Recetor and Androgen Recetor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Recetor Binding Assay to Human Estrogen Recetor 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 Recetor 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 Recetor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zrally, 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 Recetor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Regra dos 10 %: Opção de excluir da análise dados em que a média dos replicados para a percentagem de ligação específica do [³H]17β-estradiol tenha superior em 10 % ou mais à observada para o valor médio a uma concentração inferior (ver apêndice 4).

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.

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).

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

Produto químico: Uma substância ou mistura.

CV: Coeficiente de variação

E2: 17β-Estradiol

ED: desregulação do sistema endócrino

hERα: Recetor alfa de estrogénio humano

ER: Recetor de estrogénio

Atividade estrogénica: A capacidade de um produto químico reproduzir o 17β-estradiol na sua capacidade de ligação a recetores de estrogénios. O presente método de ensaio permite detetar a ligação ao hERα.

IC₅₀: a 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].

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).

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).

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»

PBTG: Diretriz de ensaio baseada no desempenho

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).

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 respostas, estarem comercialmente disponíveis e disporem de dados de referência de elevada qualidade.

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

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

Métodos de ensaio de referência: ensaios em que se baseia o PBTG 493.

RBA: Afinidade de ligação relativa. A RBA de uma substância é calculada como uma percentagem do log(IC₅₀) para a substância relativamente ao log(IC₅₀) para o 17 β -estradiol.

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).

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.

DP: desvio-padrão.

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

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).

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 RECETOR DE ESTROGÊNIO (ER α) COM RECURSO A ER α 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 recetor de estrogénio (ER) utiliza o recetor 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 recetor.

6. 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, 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 recetores para afinidade de ligação e número de recetores 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 recetor de estrogénio com o seu ligando natural (representado pela constante de dissociação, K_d) e a concentração de pontos de recetores ativos ($B_{\text{máx}}$).
8. A experiência de ligação competitiva mede a afinidade de uma substância para competir com o $[^3\text{H}]17\beta$ -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 $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol (designada «concentração inibidora 50 %» ou « IC_{50} »). A afinidade pode igualmente ser avaliada através da afinidade de ligação relativa (RBA, em relação à IC_{50} do estradiol, medida separadamente na mesma série de ensaios). A experiência de ligação competitiva mede a ligação do $[^3\text{H}]17\beta$ -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 $[^3\text{H}]17\beta$ -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 $[^3\text{H}]17\beta$ -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 (17β -estradiol)], um ligante fraco (por exemplo, noretinodrel ou norentinodrona), e um não ligante (octiltrióxissilano, OTES). Cada laboratório deve

estabelecer uma base de dados histórica para documentar a coerência do IC₅₀ 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
17β-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
Noretinedrona^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) ± 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 ± 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 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 IC₅₀ com base nas condições de realização do ensaio.

Demonstração da competência técnica do laboratório

- 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)

- 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 (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 μ M 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 [^{3} H]17 β -estradiol, nas três condições seguintes (ver quadro 2):
- Ausência de 17 β -estradiol não marcado e presença de ER. Trata-se de determinar a ligação total por medida da radioatividade nos poços que apenas têm [^{3} H]17 β -estradiol.
 - Presença de uma concentração excessiva (1 000 vezes mais) de 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 [^{3} H]17 β -estradiol e de 17 β -estradiol não marcado

15. As diluições de [^{3} H]17 β -estradiol devem ser preparadas por adição de tampão de ensaio a uma solução-mãe de [^{3} H]17 β -estradiol 12 nM para obter concentrações inicialmente compreendidas entre 0,12 nM e 12 nM. Adicionando 40 μ l destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços (para um volume final de 160 μ l), obtêm-se concentrações finais compreendidas entre 0,03 e 3,0 nM. A preparação do tampão de ensaio, da solução e diluições de [^{3} H]17 β -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 μ M e 6 μ M. Adicionando 80 μ l 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±5 % (ver os pontos 12 a 13). A solução de hrERIα 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]17β-estradiol, 17β-estradiol não marcado, tampão e recetor.

Quadro 2: Configuração da placa de microtitulação no ensaio de ligação por saturação

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	
<i>A</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Ligante total (solvente)
<i>B</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
<i>C</i>													
<i>D</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Ligante não específico
<i>E</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
<i>F</i>													
<i>G</i>													
<i>H</i>													

[3H] E2: [3H]17β-estradiol

ER: recetor de estrogénio

E2: 17β-estradiol não marcado

19. As placas de microtitulação devem ser incubadas a 2-8° C, durante 16-20 horas, e colocadas num mecanismo de rotação durante o período de incubação.

Medição de [3H]17β-estradiol ligado à hrERα

20. O [3H]17β-estradiol ligado ao hrERα deve ser separado do [3H]17β-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]17β-estradiol ligado ao hrERα durante este processo, é extremamente importante que os tampões e os poços sejam mantidos a 2-8 °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]17β-estradiol ligado ao hrERα.
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]17β-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]17β-estradiol. Estas medidas demonstram quanto [³H]17β-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] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Ligante total (solvente)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Ligante não específico
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G	0,03 nM [³ H] E ₂ (dpms total)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			Dpms total*
H	0,30 nM [³ H] E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂			

[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 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 preparar-se, em etanol, oito soluções de 17β-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 octiltriatoxissilano (OTES, n.º CAS 2943-75-1) 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 1000 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 (octiltrietoxissilano), 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 (1×10 ⁻⁷)			E2 (1×10 ⁻⁸)			E2 (1×10 ^{-8,5})			E2 (1×10 ⁻⁹)		
C	E2 (1×10 ^{-9,5})			E2 (1×10 ⁻¹⁰)			E2 (1×10 ⁻¹¹)			Vazio*		
D	NE (1×10 ^{-4,5})			NE (1×10 ⁻⁵)			NE (1×10 ^{-5,5})			NE (1×10 ⁻⁶)		
E	NE (1×10 ^{-6,5})			NE (1×10 ⁻⁷)			NE (1×10 ^{-7,5})			NE (1×10 ^{-8,5})		
F	OTES (1×10 ⁻³)			OTES (1×10 ⁻⁴)			OTES (1×10 ⁻⁵)			OTES (1×10 ⁻⁶)		
G	OTES (1×10 ⁻⁷)			OTES (1×10 ⁻⁸)			OTES (1×10 ⁻⁹)			OTES (1×10 ⁻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 (1×10 ^{-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 µl 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 µl de uma solução de 4 nM [3H]17β-estradiol. Após uma rotação delicada durante 10 a 15 minutos, entre 2 e 15 °C, adicionam-se 40 µl da solução de hrERα. As placas de microtitulação do ensaio devem ser incubadas a uma temperatura de 2 a 8 °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 (µl)	Componente
80	17β-Estradiol não marcado, noretinodrel, OTES, produtos químicos em estudo, solvente ou solução-tampão
40	Solução de 4 nM [³ H]17β-estradiol
40	Solução de hrERα com a concentração determinada
160	Volume total em cada poço

39. 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 80 µl 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 o dpms do [³H]17β-estradiol marcado em 40 µl. A alíquota de 40 µl 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 séries 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 IC_{50} para o estrogénio de referência (17β -estradiol) deve ser aproximadamente igual à concentração molar de $[^3H]17\beta$ -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 $[^3H]17\beta$ -estradiol do hrER α 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) $\pm$ 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, $\log(IC_{50})$] $\log IC_{50}$) para os estrogénios de referência e ligantes fracos, e para o $\log_{10}(RBA)$ $\log_{10} RBA$ 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 IC_{50} 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]17 β -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 β -estradiol deve atingir um plano para o indicativo máximo específico da ligação por saturação do hrER α [^3H -17H] β -estradiol. Além disso, a análise dos dados deve documentar a ligação do [^3H]17 β -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]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} .
55. 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; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). 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. 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 $\log(\text{IC}_{50})$ para o ligante fraco em relação ao $\log(\text{IC}_{50})$

para o 17 β -estradiol. Os resultados dos controlos positivos e do controlo 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]17 β -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 hrER α 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 %.

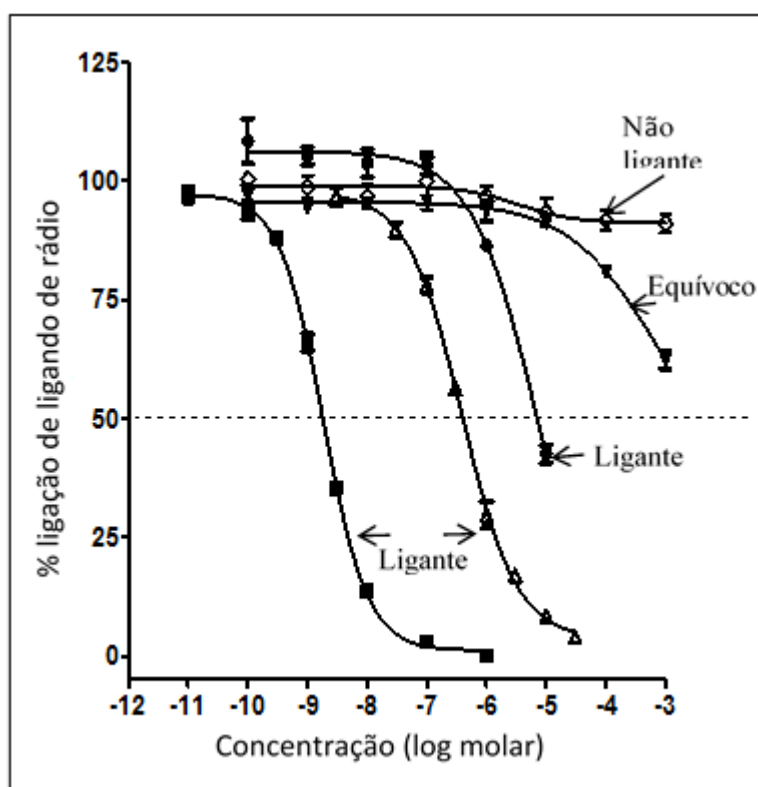
59. Os produtos químicos em estudo são considerados equívocos se nenhuma das condições acima referidas estiver preenchida (por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

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

[³H]E2: 17 β -Estradiol com marcação radioativa por trítio

DCC: Carvão revestido com dextrose

E2: 17 β -Estradiol não marcado (inerte)

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

hrER α : 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 produtos químicos em estudo.

Série de ensaios: Um 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 hrER α (viz., total [³H]17 β -estradiol adicionado ao poço, ligação máxima do [³H]17 β -estradiol ao hrER α 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.

Apêndice 2.2

ENSAIO DE SATURAÇÃO TÍPICA DO [³H]17B-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 (uM)	Volume a frio do E2 (μl)	Concentração final a frio do E2 (uM)	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
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

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 de E2 a frio (μM)	Volume a frio do E2 (μl)	Concentração final de E2 a frio (μM)	Volume do tampão (μl)	Volume do receptor (μl)	Volume total em poços
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
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
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 (μl)	Volume do tampão (μl)	Volume (μl) do traçador (E2 quentes)	Volume a partir da placa de diluição (μl)	Volume final (μl)	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
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
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

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 do tampão (μl)	Volume (μl) do traçador (E2)	Volume a partir da placa de diluição (μl)	Volume final (μl)	Concentração final do concorrente (M)
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
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
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	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	Tampão de	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	Tampão de	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	Tampão de	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	Tampão de	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	Tampão de	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 (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	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	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Produto químico	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Produto químico	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Produto químico	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Produto químico	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Produto químico	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Produto químico	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Produto químico	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Produto químico	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Produto químico	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Produto químico	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Produto químico	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	C1	1	Produto químico	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Produto químico	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Produto químico	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Produto químico	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Produto químico	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Produto químico	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Produto químico	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Produto químico	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Produto químico	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Produto químico	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Produto químico	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Produto químico	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Produto químico	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Produto químico	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Produto químico	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Produto químico	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Produto químico	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Produto químico	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Produto químico	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Produto químico	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Produto químico	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Produto químico	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Produto químico	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Produto químico	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	E1	1	Produto químico	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Produto químico	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Produto químico	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07

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 acentuado)	Volume da placa de diluição (μl)	Volume final (μl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	E4	1	Produto químico	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Produto químico	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Produto químico	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Produto químico	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Produto químico	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Produto químico	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Produto químico	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Produto químico	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Produto químico	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Produto químico	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Produto químico	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Produto químico	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Produto químico	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Produto químico	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Produto químico	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Produto químico	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Produto químico	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Produto químico	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Produto químico	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Produto químico	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Produto químico	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	G1	1	Produto químico	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Produto químico	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Produto químico	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Produto químico	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Produto químico	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Produto químico	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Produto químico	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Produto químico	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Produto químico	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Produto químico	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Produto químico	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Produto químico	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 RECETOR DO ESTROGÊNIO 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 recetor 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 recetor.

6. 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, 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 recetores relativamente à sua afinidade de ligação e número de recetores 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 recetor de estrogénio com o seu ligando natural (representado pela constante de dissociação, K_d) e a concentração de pontos de recetores ativos ($B_{\text{máx}}$).
8. A experiência de ligação competitiva mede a afinidade de uma substância para competir com o ($[^3\text{H}]17\beta$ -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 ($[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol (designada «concentração inibidora 50 %» ou « IC_{50} »). A afinidade pode igualmente ser avaliada através da afinidade de ligação relativa (RBA, em relação à IC_{50} do estradiol, medida separadamente na mesma série de ensaios). A experiência de ligação competitiva mede a ligação do ($[^3\text{H}]17\beta$ -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 (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 noretinodrona), e um não ligante (octiltriexissilano, OTES). Cada laboratório deve estabelecer uma base de dados histórica para documentar a coerência do IC_{50} 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: Critérios de desempenho desenvolvidos para os estrogénios de referência e para o ligante fraco, ensaio de ligação de hrER do CERI.

Substância	Parâmetro	Média ^a :	Desvio-padrão (n)	Intervalos de confiança de 95 % ^b	
				Limite inferior	Limite superior
17β-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^c	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

^aO 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).

^bA confiança de 95 % é fornecida como orientação para os critérios de aceitabilidade.

^cO 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 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 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 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 μ M 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.

13. 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

14. Devem ser avaliadas em triplicado oito concentrações crescentes de [^3H]17 β -estradiol, nas três condições seguintes (ver quadro 2):
- a. 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.
 - b. Presença de uma concentração excessiva (2 000 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.
 - c. Ausência de 17 β -estradiol não marcado e ausência de ER (determinação da radioatividade total)

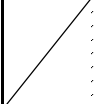
Preparação de soluções de [^3H]17 β -estradiol, de 17 β -estradiol não marcado e de hrERa

15. 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 respectivos 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 ligandos.
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] E ₂ + ER			0,0313 nM [^{3} H] E ₂ + 0,0625 μ M E ₂ + ER			0,0313 nM				0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,0625 nM [^{3} H] E ₂ + 0,125 μ M E ₂ + ER			0,0625 nM				1,25 μ M	0,625 nM
C	30,125 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,125 nM [^{3} H] E ₂ + 0,25 μ M E ₂ + ER			0,125 nM				2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,250 nM [^{3} H] E ₂ + 0,5 μ M E ₂ + ER			0,250 nM				5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,50 nM [^{3} H] E ₂ + 1 μ M E ₂ + ER			0,50 nM				10 μ M	5 nM
F	1,00 nM [^{3} H] E ₂ + ER			1,00 nM [^{3} H] E ₂ + 2 μ M E ₂ + ER			1,00 nM				20 μ M	10 nM
G	2,00 nM [^{3} H] E ₂ + ER			2,00 nM [^{3} H] E ₂ + 4 μ M E ₂ + ER			2,00 nM				40 μ M	20 nM

H	4,00 nM [³ H] E ₂ + ER	4,00 nM [³ H] E ₂ + 8 μM E ₂ + ER	4,00 nM		80 μM	40 nM

TB: ligação total

NSB: ligação não específica

[³H] E₂: [³H]17β-estradiol

E₂: 17β-estradiol não marcado

* As concentrações indicadas neste caso são as concentrações finais em cada poço.

**As diluições de E₂ e [³H]E₂ não marcados podem ser preparadas numa placa diferente.

Quadro 3: Volumes 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 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 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 ser preparadas oito soluções do 17 β -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, 10⁻¹¹ M. A maior concentração de 17 β -estradiol (1 μ M) 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 octiltriethoxissilano (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 hrER α . Devem ser preparadas oito soluções do não ligante em DMSO e tampão de ensaio, com as seguintes concentrações finais nos poços: 10⁻³, 10³10⁻⁴, 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 M.

Concentração do hrER α

30. Deve ser utilizada a quantidade de recetor que dá um valor específico de ligação de 40 $\pm$ 10 % (ver pontos 12-13 do apêndice 3). A solução hrER α deve ser preparada por diluição do hrER α funcional em tampão gelo frio imediatamente antes do uso.

[³H]17 β -estradiol

31. A concentração final de [³H]17 β -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 $\log(IC_{50})$ 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). Os resultados finais deve refletir a extensão suficiente das concentrações para os dois lados do $\log(IC_{50})$, 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), e o controlo do tampão, as 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)

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
	Controlo do tampão e controlo positivo (E2)			Fracamente positivo Noretinodrel			Controlo negativo (OTES)			TB e NSB		
<i>A</i>	Vazio*			1×10 ⁻⁹ M			1×10 ⁻¹⁰ M			TB (controlo de solvente) (2,05 % DMSO)		
<i>B</i>	E2 (1×10 ⁻¹¹ M)			1×10 ⁻⁸ M			1×10 ⁻⁹ M					
<i>C</i>	E2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			1×10 ^{-7,5} M			1×10 ⁻⁸ M			NSB (10 ⁻⁶ M E2)		
<i>D</i>	E2 (1×10 ^{-9,5} M)			1×10 ⁻⁷ M			1×10 ⁻⁷ M					
<i>E</i>	E2 (1×10 ⁻⁹ M)			1×10 ^{-6,5} M			1×10 ⁻⁶ M			Tampão de controlo		
<i>F</i>	E2 (1×10 ^{-8,5} M)			1×10 ⁻⁶ M			1×10 ⁻⁵ M					
<i>G</i>	E2 (1×10 ⁻⁸ M)			1×10 ^{-5,5} M			1×10 ⁻⁴ M			Vazio (para quente)**		
<i>H</i>	E2 (1×10 ⁻⁷ M)			1×10 ^{-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		
<i>A</i>	TC-1 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-3 (1×10 ⁻¹⁰ M)			E2 (1×10 ⁻⁷ M)		
<i>B</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁹ M)			E ₂ (IC ₅₀)		
<i>C</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁸ M)			NE (1×10 ^{-4,5} M)		
<i>D</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁷ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁷ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁷ M)			NE (IC ₅₀)		
<i>E</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁶ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁶ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁶ M)			NSB (10 ⁻⁶ M E2)		
<i>F</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁵ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁵ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁵ M)					
<i>G</i>	TC-1 (1×10 ⁻⁴ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁴ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁴ M)			TB (controlo de solvente)		
<i>H</i>	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 coluna número		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
	E ₂ 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
	A concentração de rERα 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]17 β -estradiol ao hrER α , após a separação do [^3H]17 β -estradiol ligado ao hrER α do [^3H]17 β -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]17 β -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]17 β -estradiol, indicando saturação do hrER α com o ligando.
41. A ligação específica a 0,5 nM de [^3H]17 β -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 séries 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 e 17 β -estradiol com marcação radioativa do β -estradiol.

Ensaio de ligação competitiva

44. O aumento das concentrações do 17 β -estradiol não marcado deve deslocar o [^3H]17 β -estradiol do recetor de forma compatível com uma ligação competitiva num sítio.
45. O valor de IC₅₀ para o estrogénio de referência (i.e., 17 β -estradiol) deve ser aproximadamente igual à concentração molar de [^3H]17 β -estradiol mais o Kd determinado a partir do ensaio de saturação da ligação.
46. A ligação específica total deve estar consistentemente dentro de um intervalo aceitável de 40 $\pm$ 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 séries 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]17 β -estradiol do hrER α 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 uma conferência de 95 % para os parâmetros de ajustamento da curva [isto é, topo, base, curva de Hill e $\log(\text{IC}_{50})$] para os estrogénios de referência e os ligantes fracos, e o $\log_{10}(\text{RBA})$ / $\text{Log}_{10}\text{RBA}$ 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 β -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 β -estradiol deve atingir um plano para o indicativo máximo específico da ligação por saturação do hrER α [^{3} -17H] β -estradiol. Além disso, a análise dos dados deve documentar a ligação do [^3H]17 β -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 $B_{\text{máx}}$ 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 $B_{\text{máx}}$ 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 β -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 β -estradiol é IC_{50} .
54. 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; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). 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. 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 $\log(\text{IC}_{50})$ 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 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]17 β -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 hrER α 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:

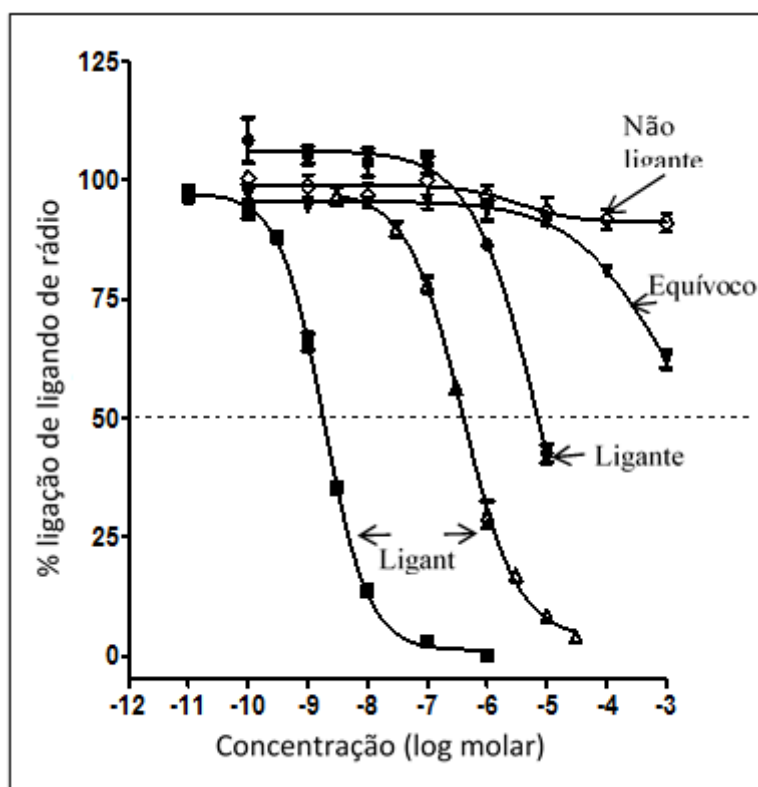
- For possível ajustar uma curva de ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for superior a 75 %, ou
- Não for possível ajustar uma curva de ligação e a média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração dos dados for superior a 75 %.

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 $< 0,5$

60. Ver ponto 24 de «COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO hrER» do presente método de ensaio.

Apêndice 3.1

LISTA DE TERMOS

[³H]E2: 17β-Estradiol com marcação radioativa por trítio

DCC: Carvão revestido com dextrose

E2: 17β-Estradiol não marcado (inerte)

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

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 produtos químico em estudo.

Série de ensaios: Um 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.

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 (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	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
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
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
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

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 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	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
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
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	OTES8DBP7	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	-
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	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Tampão de	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Tampão de	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Tampão de	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Tampão de	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Tampão de	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Vazio (para	Quente	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Vazio (para	Quente	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Vazio (para	Quente	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Vazio (para	Quente	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Vazio (para	Quente	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Vazio (para	Quente	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Note-se que os poços «quentes» estão vazios durante a incubação. Os 10 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 (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	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
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
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
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

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 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	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
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
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	S	E2 _{máx1}	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Controlo E2	S	E2 _{máx2}	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Controlo E2	S	E2 _{máx3}	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Controlo E2	S	E2IC ₅₀₁	E2IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B11	2	Controlo E2	S	E2IC ₅₀₂	E2IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B12	3	Controlo E2	S	E2IC ₅₀₃	E2IC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	C10	1	Controlo NE	S	NE _{máx1}	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Controlo NE	S	NE _{máx2}	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Controlo NE	S	NE _{máx3}	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Controlo NE	S	NEIC ₅₀₁	NEIC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D11	2	Controlo NE	S	NEIC ₅₀₂	NEIC ₅₀ × 10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D12	3	Controlo NE	S	NEIC ₅₀₃	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
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	-

Apêndice 4

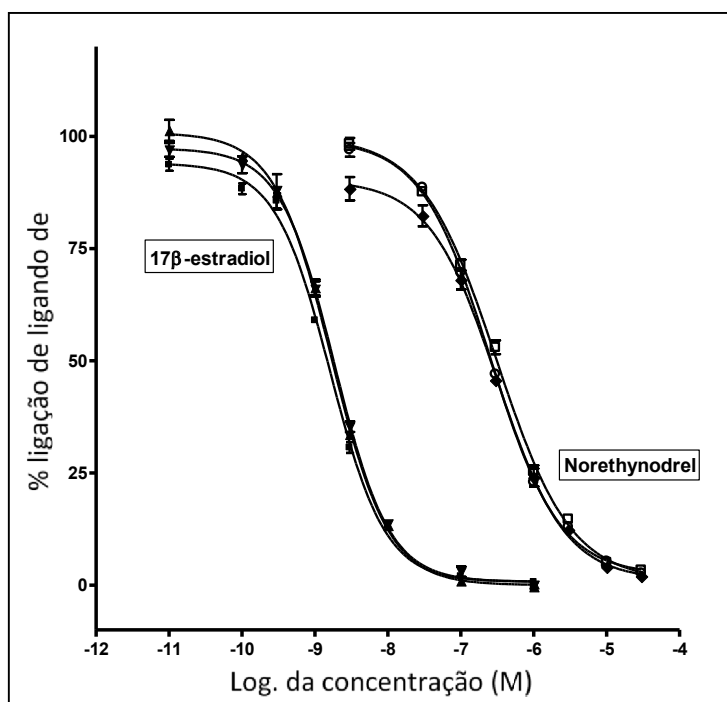
CONSIDERAÇÕES PARA A ANÁLISE DE DADOS DO ENSAIO DE LIGAÇÃO COMPETITIVA HRER

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 [$\log_{10}(\text{unidades})$] do concorrente. A concentração do produto químico em estudo que inibe 50 % da ligação máxima específica do [^3H]17 β -estradiol é IC₅₀.

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 CERI, 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 ligando 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 CERI, 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.

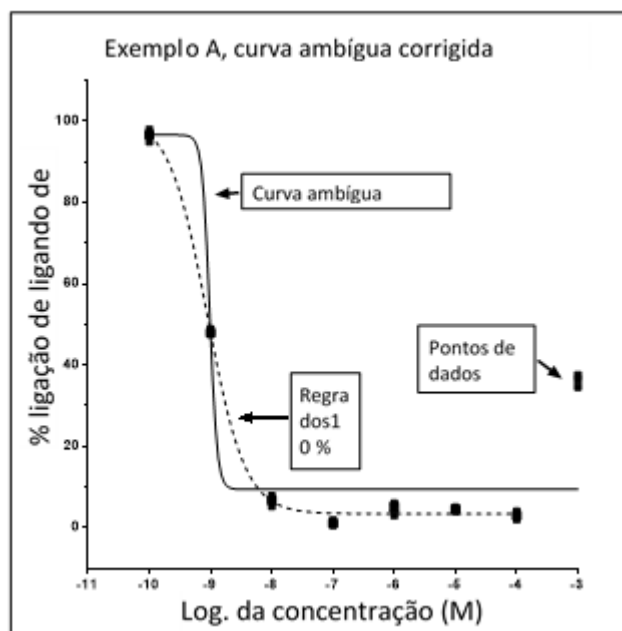


Análise de dados relativos aos produtos químicos em estudo

- 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. Cada série de ensaios para um produto químico em estudo é inicialmente submetida a uma análise de dados normalizada idêntica à utilizada para os estrogénios de referência e para os 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. Aquando da análise dos resultados de cada produto químico em estudo, devem ser utilizados critérios profissionais e os dados utilizados para classificar cada produto químico em estudo como ligante ou não ligante devem ser cientificamente justificados.
- Ocasionalmente, podem existir exemplos de dados que exijam uma atenção adicional na análise e interpretação adequada dos dados relativos à ligação do hrER. Estudos anteriores revelaram casos em que a análise e a interpretação de dados relativos à ligação competitiva ao recetor podem ser complicadas por uma mudança da percentagem específica de ligação no ensaio de produtos químicos com as concentrações mais elevadas (figura 2). Este é um

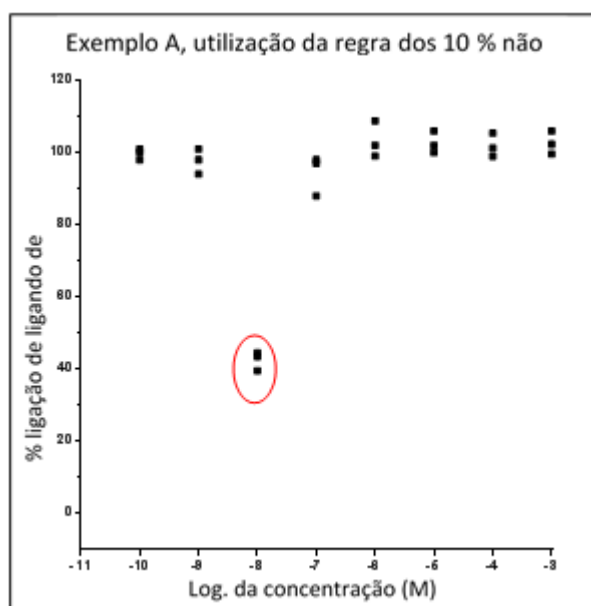
problema bem conhecido, que ocorre quando se utilizam protocolos para uma série de ensaios de ligação competitiva ao recetor (3). Nestes casos, a resposta é dependente da concentração observada em concentrações mais baixas, mas, como a concentração do produto químico em estudo se aproxima do limite de solubilidade, o deslocamento do $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol não diminui. Nestes casos, os dados relativos às concentrações mais elevadas indicam que o limite biológico do ensaio foi atingido. Por exemplo, este fenómeno está muitas vezes associado à insolubilidade e à precipitação dos produtos químicos em concentrações elevadas, embora também possa ser um reflexo da capacidade excessiva do carvão revestido de dextrano para capturar o ligando com marcação radioativa livre durante o procedimento de separação em concentrações químicas mais elevadas. Manter os pontos de dados em que os dados sobre o ajustamento da ligação competitiva a uma curva sigmoide pode, por vezes, conduzir a uma classificação incorreta do potencial de ligação do ER a um produto químico em estudo (figura 2). Para evitar tal facto, o protocolo relativo aos ensaios de ligação de FW e de hrER do CERI prevê a opção de excluir da análise pontos de dados em que a média dos replicados para a percentagem de ligação específica do $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol seja superior em 10 % ou mais à observada para o valor médio a uma concentração inferior (conhecida por «regra dos 10 %»). Esta regra apenas pode ser utilizada uma vez para uma curva determinada e deve haver dados remanescentes relativos a, pelo menos, 6 concentrações, de modo a que a curva possa ser corretamente classificada.

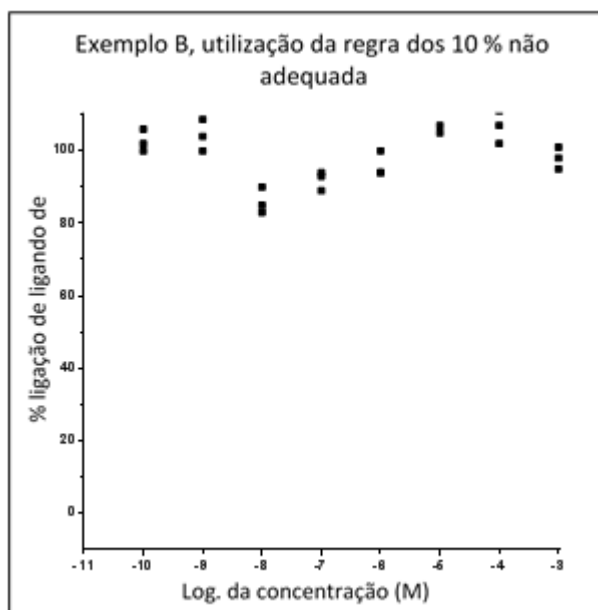
Figura 2: Exemplos de curvas de ligação competitiva com e sem recurso à regra dos 10 %



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 Recetor Alpha (hrERα)*, 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](http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf)
- (3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Recetors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.