



Conselho da
União Europeia

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

6800/19
ADD 2

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

n.º doc. Com.:	D060575/02 - Anexo
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

B.71 ENSAIOS DE SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* RESPEITANTES A EVENTOS ESSENCIAIS DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA VIA DETERMINANTE DOS EFEITOS NOCIVOS PARA A SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

INTRODUÇÃO GERAL

Método de ensaio baseado no evento essencial relativo à ativação das células dendríticas

1. Um sensibilizante cutâneo é uma substância que provoca uma reação alérgica após contacto com a pele, conforme definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (GHS da ONU) (1) e o Regulamento (UE) n.º 1272/2008 relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CLP)¹. Existe consenso quanto aos principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. Os conhecimentos atuais sobre os mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea foram sintetizados na forma de uma via determinante dos efeitos nocivos (AOP — *Adverse Outcome Pathway*) no âmbito do programa AOP da OCDE (2), desde o evento molecular iniciador, passando pelos eventos intermédios, até ao efeito nocivo, designadamente a dermatite alérgica de contacto. Neste caso, o evento molecular iniciador (isto é, o primeiro evento essencial) é a ligação covalente das substâncias eletrófilas aos centros nucleófilos das proteínas da pele. O segundo evento essencial nesta AOP tem lugar nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como variações na expressão de genes associadas a vias de sinalização celular específicas, como as vias dependentes do elemento de resposta antioxidante/eletrófilo (ARE — *Antioxidant Response Element*). O terceiro evento essencial é a ativação das células dendríticas, normalmente avaliada com base na expressão de marcadores específicos da superfície celular (quimocinas e citocinas). O quarto evento essencial consiste na ativação e na proliferação de células T, que é avaliada indiretamente no ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (LLNA — *Local Lymph Node Assay*) (3).

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

2. O presente método de ensaio é equivalente à orientação de ensaio (TG — *Test Guideline*) 442E (2017) da OCDE. Descreve os ensaios *in vitro* respeitantes aos mecanismos descritos no evento essencial relativo à ativação das células dendríticas na AOP para a sensibilização cutânea (2). O método de ensaio inclui ensaios para apoiar a discriminação entre sensibilizantes e não sensibilizantes cutâneos, em conformidade com o GHS da ONU e com o CLP.

Os ensaios descritos no presente método de ensaio são os seguintes:

- Teste de ativação da linha celular humana (h-CLAT)
 - Teste de ativação da linha celular U937 (U-SENS™)
 - Ensaio por gene repórter da interleucina-8 (ensaio IL-8 Luc)
3. Os ensaios incluídos no presente método e as orientações de ensaio da OCDE correspondentes podem diferir em relação ao procedimento utilizado para gerar os dados e efetuar as medições, mas podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as exigências dos países quanto aos resultados dos ensaios sobre o evento essencial de ativação das células dendríticas na AOP para a sensibilização cutânea, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados da OCDE.

Antecedentes e princípios dos ensaios incluídos no método de ensaio baseado nos eventos essenciais

4. Tradicionalmente, a determinação da sensibilização cutânea implica o recurso a animais de laboratório. Os métodos clássicos que utilizam porquinhos-da-índia — ensaio de maximização com porquinhos-da-índia (GMPT) de Magnusson e Kligman e ensaio de Buehler (TM B.6) (4) — avaliam as fases de indução e de desencadeamento da sensibilização cutânea. Vulgarizaram-se também os ensaios com murídeos, o LLNA (TM B.42) (3) e duas alterações deste sem recurso a isótopos radioativos — LLNA: DA (TM B.50) (5) e LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6) —, que determinam exclusivamente a resposta indutiva, uma vez que apresentam vantagem em relação aos ensaios com porquinhos-da-índia no tocante ao bem-estar animal e proporcionam uma medição objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.
5. Mais recentemente, foram adotados métodos de ensaio de tipo mecanístico *in chemico* e *in vitro* respeitantes ao primeiro evento essencial (TM B.59; ensaio de reatividade direta de péptidos (7)) e ao segundo evento essencial [TM B.60; método ARE-Nrf2 luciferase (8)] da AOP de sensibilização cutânea, a fim de contribuir para a avaliação do potencial de perigo de sensibilização cutânea dos produtos químicos.

6. Os ensaios descritos no presente método de ensaio permitem quantificar quer as variações na expressão do(s) marcador(es) da superfície celular associada(s) ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas após a exposição a um sensibilizante (por exemplo, CD54, CD86), quer as variações na expressão da IL-8, uma citocina associada à ativação das células dendríticas. Existem referências de que os sensibilizantes cutâneos induzem a expressão de marcadores da membrana celular, nomeadamente CD40, CD54, CD80, CD83 e CD86, para além de induzirem citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β e a TNF- α , e várias quimocinas, entre as quais a IL-8 (CXCL8) e a CCL3 (9) (10) (11) (12), associados à ativação das células dendríticas (2).
7. No entanto, como a ativação das células dendríticas representa apenas um evento essencial da AOP de sensibilização cutânea (2) (13), as informações geradas pelos ensaios que medem unicamente os marcadores da ativação das células dendríticas podem não bastar para concluir a existência ou ausência de potencial de sensibilização cutânea dos produtos químicos. Por conseguinte, propõem-se os dados gerados com os ensaios descritos no presente método de ensaio para ajudar a distinguir os sensibilizantes (ou seja, categoria 1 do GHS da ONU/CLP) dos não sensibilizantes cutâneos utilizados no âmbito das abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA — *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), juntamente com outras informações complementares decorrentes, por exemplo, de ensaios *in vitro* respeitantes a outros eventos essenciais da AOP de sensibilização cutânea, bem como métodos sem ensaios, nomeadamente a interpolação com base em dados relativos a produtos químicos análogos (13). Encontram-se na literatura exemplos de utilização dos dados obtidos com estes ensaios no âmbito de abordagens definidas – ou seja, abordagens normalizadas no que diz respeito ao conjunto de fontes de informação utilizadas e aos procedimentos de análise dos dados para efeitos de previsão (13) –, que podem ser elementos úteis no âmbito das IATA.
8. Os ensaios descritos no presente método não podem ser utilizados isoladamente, nem para classificar os sensibilizantes cutâneos nas subcategorias 1A e 1B do GHS da ONU/CLP pelas autoridades responsáveis pela aplicação destas duas subcategorias facultativas, nem para prever o potencial de sensibilização no contexto de avaliações de segurança. Todavia, consoante o quadro regulamentar, os resultados positivos obtidos com estes métodos podem ser utilizados isoladamente para classificar um produto químico na categoria 1 do GHS da ONU/CLP.

9. No presente método de ensaio, o termo «produto químico em estudo» designa o produto que é objeto do ensaio¹ e não as substâncias monocomponentes, substâncias multicomponentes e/ou misturas às quais os métodos sejam aplicáveis. Atualmente, dispõe-se de informações limitadas sobre a aplicabilidade dos ensaios a substâncias multicomponentes/misturas (14) (15). Os ensaios são, porém, tecnicamente aplicáveis ao ensaio de substâncias multicomponentes e misturas. Contudo, antes da aplicação do presente método de ensaio a uma mistura para se obterem dados para efeitos regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito². Tais considerações não são necessárias se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. Acresce que, no caso de ensaios de substâncias multicomponentes ou de misturas, deve ser tida em conta a possível interferência de componentes citotóxicos com as respostas observadas.

¹ Em junho de 2013, na Reunião Conjunta da OCDE, foi decidido que, sempre que possível, deverá ser aplicada uma utilização mais coerente do termo «produto químico em estudo», descrevendo o produto que é objeto do ensaio em orientações de ensaio novas e atualizadas da OCDE.

² Esta frase foi proposta e aprovada na reunião do WNT de abril de 2014

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Capítulo B.42 do presente anexo: Ensaio de gânglios linfáticos locais. Capítulo B.6 do presente anexo: Sensibilização cutânea.
- (4) Capítulo B.50 do presente anexo: Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: DA.
- (5) Capítulo B.51 do presente anexo: Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: BrdU-ELISA.
- (6) Capítulo B.59 do presente anexo: Sensibilização cutânea *in chemico*: ensaio de reatividade direta de péptidos (DPRA).
- (7) Capítulo B.60 do presente anexo: Sensibilização cutânea *in vitro*: método ARE-Nrf2 luciferase.
- (8) Steinhman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation

of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/HA\(2016\)29](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Apêndice 1

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: TESTE DE ATIVAÇÃO DA LINHA CELULAR HUMANA (H-CLAT)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. O método de ensaio h-CLAT permite quantificar as variações na expressão dos marcadores da superfície celular associadas ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas (ou seja, CD86 e CD54), na linha celular da leucemia monocítica humana THP-1, após a exposição a sensibilizantes (1) (2). Os níveis de expressão medidos para os marcadores da superfície celular CD86 e CD54 são, em seguida, utilizados para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.
2. O método de ensaio h-CLAT foi avaliado num estudo de validação coordenado pelo Laboratório de Referência da União Europeia para as Alternativas à Experimentação em Animais (EURL ECVAM), seguido de uma análise independente por pares do Comité Científico Consultivo do EURL ECVAM (ESAC). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o método foi recomendado pelo EURL ECVAM (3) para utilização no âmbito de uma IATA, com o objetivo de ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. As referências bibliográficas contêm exemplos da utilização de dados h-CLAT combinados com outras informações (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. O método de ensaio h-CLAT demonstrou ser transferível para laboratórios com experiência em técnicas de cultura celular e análise por citometria de fluxo. O nível de reprodutibilidade esperado das previsões decorrentes do ensaio é da ordem dos 80 %, tanto intralaboratorial como interlaboratorial (3) (12). Os resultados do estudo de validação (13) e de outros estudos publicados (14) indicam, em termos gerais, que, comparativamente com os resultados obtidos pelo método LLNA, a precisão na distinção entre sensibilizantes cutâneos (cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 85 % (N=142), com uma sensibilidade de 93 % (94/101) e uma especificidade de 66 % (27/41), a partir de uma nova análise do EURL ECVAM (12), tendo em conta todos os dados existentes, mas excluindo os resultados negativos obtidos para produtos químicos com coeficiente de partição octanol-água (log P) superior a 3,5, conforme descrito no ponto 4. É mais provável que os falsos resultados negativos nas previsões efetuadas com o método h-CLAT digam respeito a produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo a moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que a produtos químicos com um potencial de

sensibilização cutânea elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (4) (13) (15). No seu conjunto, estas informações demonstram a utilidade do método h-CLAT para a identificação dos perigos de sensibilização cutânea. No entanto, os valores relativos à precisão do método de ensaio h-CLAT utilizado isoladamente são meramente indicativos, uma vez que este método deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA, tal como outros ensaios que utilizam animais, pode não refletir de forma adequada a situação no ser humano.

4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o método h-CLAT é aplicável a produtos químicos em estudo que abrangem uma grande diversidade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potências de sensibilização cutânea (determinadas em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (3) (14) (15). O método é aplicável a produtos químicos solúveis ou que formem uma dispersão estável – ou seja, um coloide ou uma suspensão em que o produto em estudo não se deposite nem se separe do solvente/veículo formando diferentes fases – num solvente/veículo adequado (ver ponto 14). Os produtos químicos com log P superior a 3,5 tendem a produzir resultados negativos falsos (14). Por conseguinte, os resultados negativos obtidos com produtos químicos em estudo que apresentem um log P superior a 3,5 não devem ser tidos em conta. No entanto, os resultados positivos obtidos com produtos químicos em estudo que apresentem um log P superior a 3,5 poderão ser utilizados para ajudar a identificar o produto químico em estudo como sensibilizante cutâneo. Além disso, devido à limitada capacidade metabólica da linha celular utilizada (16) e às condições experimentais, os pró-haptenos (substâncias que requerem ativação enzimática, por exemplo através das enzimas P450) e os pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação), em particular os que apresentem uma taxa de oxidação lenta, podem também produzir resultados negativos no h-CLAT (15). É possível avaliar produtos químicos fluorescentes com o h-CLAT (17). No entanto, os produtos fortemente fluorescentes que emitem no mesmo comprimento de onda que o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou que o iodeto de propídio (IP) interferem com a deteção por citometria de fluxo, pelo que não podem ser corretamente avaliados utilizando anticorpos conjugados com FITC ou IP. Neste caso, é possível recorrer, respetivamente, a outros anticorpos marcados com fluorocromos ou a outros marcadores de citotoxicidade, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos dos anticorpos marcados com FITC (ver ponto 24) ou com IP (ver ponto 18), por exemplo testando as substâncias para demonstração de competência indicadas nos apêndices 1-2. À luz do que precede, os resultados negativos devem ser interpretados no contexto das limitações indicadas e em conjunto com outras fontes de informação no âmbito da IATA. Nos casos

em que se demonstre que o método h-CLAT não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, o mesmo não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

5. Tal como descrito acima, o método h-CLAT ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. Porém, quando utilizado no âmbito de abordagens integradas do tipo IATA, pode também contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização (4) (5) (9). Contudo, é necessário continuar a trabalhar, de preferência com base em dados humanos, para determinar o modo como os resultados do h-CLAT poderão vir a ser úteis para este tipo de avaliação.
6. São apresentadas definições no apêndice 1.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O método h-CLAT é um ensaio *in vitro* que permite quantificar as variações da expressão de marcadores (CD86 e CD54) da superfície das células da linha celular da leucemia monocítica humana THP-1, após uma exposição de 24 horas ao produto químico em estudo. Estas moléculas de superfície são marcadores típicos da ativação dos monócitos THP-1 e podem imitar a ativação das células dendríticas, o que desempenha um papel crítico na ativação das células T. As variações na expressão dos marcadores de superfície são medidas por citometria de fluxo após coloração das células com anticorpos marcados com fluorocromo. A citotoxicidade é medida em paralelo, a fim de determinar se a ativação da expressão dos marcadores de superfície ocorre a concentrações subcitotóxicas. A intensidade relativa de fluorescência dos marcadores de superfície, em comparação com a do controlo do solvente/veículo, é calculada e utilizada no modelo preditivo (ver ponto 26), para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

8. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 1.2. Além disso, os utilizadores do ensaio devem manter uma base de dados históricos resultantes dos controlos de reatividade (ver ponto 11) e obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 20 a 22) e devem utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório se mantém ao longo do tempo.

PROCEDIMENTO

9. O presente método de ensaio baseia-se no protocolo n.º 158 do serviço de base de dados sobre os métodos alternativos à experimentação em animais (DB-ALM — DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation) h-CLAT (18), que é o protocolo utilizado para o estudo de validação coordenado pelo EURL ECVAM. Recomenda-se a utilização deste protocolo aquando da implementação e utilização, no laboratório, do método h-CLAT. Segue-se uma descrição dos principais elementos e procedimentos do método h-CLAT, que compreende duas etapas: um *ensaio de determinação da dose* e uma *medição da expressão de CD86/CD54*.

Preparação das células

10. Para a execução do método h-CLAT, deve utilizar-se a linha celular da leucemia monocítica humana, THP-1. Recomenda-se que as células (TIB-202™) sejam obtidas junto de um banco de células reconhecido, como a American Type Culture Collection.
11. As células THP-1 são cultivadas a 37 °C numa atmosfera humidificada a 5 % CO₂, em meio RPMI-1640 complementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. A utilização da penicilina e da estreptomicina no meio de cultura pode ser evitada. No entanto, nesse caso, os utilizadores devem verificar se a ausência de antibióticos no meio de cultura não tem qualquer impacto nos resultados, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2. De qualquer modo, para minimizar o risco de contaminação, devem seguir-se as boas práticas de cultura celular independentemente da presença ou não de antibióticos no meio de cultura celular. As células THP-1 são inoculadas regularmente a cada 2-3 dias, a uma densidade compreendida entre 0,1 e 0,2 × 10⁶ células/ml, e devem ser mantidas a uma densidade compreendida entre 0,1 e 1,0 × 10⁶ células/ml. Antes da sua utilização para o ensaio, as células devem ser qualificadas através de um controlo de reatividade. Este controlo deve ser realizado duas semanas após a descongelação, utilizando como controlos positivos o 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) (n.º CAS 97-00-7, pureza ≥ 99 %) e o sulfato de níquel (NiSO₄) (n.º CAS 10101-97-0, pureza ≥ 99 %) e como controlo negativo o ácido láctico (AL) (n.º CAS 50-21-5, pureza ≥ 85 %). Tanto o DNCB como o NiSO₄ devem dar respostas positivas para os marcadores de superfície celular CD86 e CD54; o ácido láctico deve dar uma resposta negativa para os marcadores de superfície celular CD86 e CD54. Apenas serão utilizadas para o ensaio as células que tenham passado o controlo de reatividade. As células podem ser propagadas até dois meses após a descongelação, sem ultrapassar as 30 passagens. O controlo de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 20 a 24.

12. Para o ensaio, as células THP-1 são inoculadas a uma densidade de $0,1 \times 10^6$ células/ml ou $0,2 \times 10^6$ células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante 72 horas ou 48 horas, respetivamente. É importante que a densidade celular no frasco de cultura imediatamente após o período de pré-cultura seja o mais coerente possível em cada experiência (utilizando uma das duas condições de pré-cultura acima descritas), uma vez que a densidade celular no frasco de cultura imediatamente após a pré-cultura pode influenciar a expressão de CD86/CD54 induzida por alergénios (19). No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são novamente colocadas em suspensão num meio de cultura fresco a uma densidade de 2×10^6 células/ml. Em seguida, distribuem-se as células numa placa de 24 poços de fundo plano com 500 μ l (1×10^6 células/poço) ou numa placa de 96 poços de fundo plano com 80 μ l ($1,6 \times 10^5$ células/poço).

Ensaio de determinação da dose

13. Efetua-se um *ensaio de determinação da dose* para apurar o valor CV75, ou seja, a concentração do produto químico em estudo que resulta numa viabilidade celular (CV) de 75 %, em comparação com o controlo do solvente/veículo. O valor CV75 é utilizado para determinar a concentração de produtos químicos em estudo a utilizar para a medição da expressão de CD86/CD54 (ver pontos 20 a 24).

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

14. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. No caso do método h-CLAT, os produtos químicos em estudo são dissolvidos ou dispersos de forma estável (ver também o ponto 4) escolhendo de preferência como solvente/veículo uma solução salina ou o meio ou, como segunda opção, dimetilsulfóxido (DMSO, pureza ≥ 99 %), se o produto químico não for solúvel ou não formar uma dispersão estável nos dois solventes/veículos anteriores, até concentrações finais de 100 mg/ml (solução salina ou meio) ou de 500 mg/ml (DMSO). É possível utilizar solventes/veículos diferentes dos acima descritos, desde que a escolha seja suficientemente fundamentada do ponto de vista científico. Deve ter-se em conta a estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo final.
15. A partir das soluções-mãe dos produtos químicos em estudo a 100 mg/ml (em solução salina ou meio) ou a 500 mg/ml (em DMSO), devem efetuar-se as diluições seguintes:
- Se o solvente/veículo for a solução salina ou o meio: preparam-se oito soluções-mãe (oito concentrações) através de uma série de diluições de fator 2 utilizando o solvente/veículo correspondente. Estas soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 50 no meio de cultura (soluções de trabalho). Se a concentração final máxima de 1 000 μ g/ml na

placa não for tóxica, a concentração máxima deve ser novamente determinada através da realização de um novo ensaio de citotoxicidade. A concentração final na placa não deve exceder 5 000 µg/ml para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável na solução salina ou no meio.

- Se o solvente/veículo for o DMSO: preparam-se oito soluções-mãe (oito concentrações) através de uma série de diluições de fator 2 utilizando o solvente/veículo correspondente. Estas soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 250 no meio de cultura (soluções de trabalho). A concentração final na placa, mesmo que não seja tóxica, não deve exceder 1 000 µg/ml.

Para a exposição, utilizam-se, por fim, as soluções de trabalho, adicionando o mesmo volume de cada uma destas ao volume de células THP-1 em suspensão na placa (ver também o ponto 17), a fim de obter uma diluição suplementar de fator 2 (em geral, as concentrações finais na placa encontram-se no intervalo entre 7,81-1 000 µg/ml).

16. O controlo do solvente/veículo utilizado no método h-CLAT é o meio de cultura (para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável (ver ponto 4) no meio ou na solução salina) ou o DMSO (para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável no DMSO) a uma concentração final única de 0,2 % na placa. Efetua-se uma diluição idêntica à descrita para as soluções de trabalho no ponto 15.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

17. O meio de cultura ou as soluções de trabalho, que se descrevem nos pontos 15 e 16, misturam-se na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões celulares preparadas na placa de 24 poços ou de 96 poços de fundo plano (ver ponto 12). As placas tratadas são, em seguida, incubadas durante $24 \pm 0,5$ horas a 37 °C, 5 % CO₂. Deve ter-se o cuidado de evitar a evaporação dos produtos químicos em estudo, caso sejam voláteis, e a contaminação cruzada entre poços pelos referidos produtos, por exemplo selando a placa antes da incubação com os produtos químicos em estudo (20).

Coloração com iodeto de propídio (IP)

18. Após $24 \pm 0,5$ horas de exposição, as células são transferidas para tubos de ensaio e recolhidas por centrifugação. Rejeitam-se os sobrenadantes e as restantes células são novamente colocadas em suspensão em 200 µl (no caso da placa de 96 poços) ou 600 µl (no caso da placa de 24 poços) de um tampão fosfato salino contendo 0,1 % de albumina de soro bovino (tampão de coloração). Transferem-se 200 µl da suspensão de células para uma placa de 96 poços de fundo redondo (no caso da placa de 96 poços) ou para um microtubo (no caso da placa de 24 poços); em seguida, as células são lavadas duas vezes com 200 µl (no caso da placa de 96 poços) ou 600 µl (no caso da placa de 24 poços) de

tampão de coloração. Por último, as células são novamente suspensas no tampão de coloração (por exemplo, 400 µl), sendo acrescentada uma solução de IP (por exemplo, 20 µl) (para obter, por exemplo, uma concentração final de IP de 0,625 µl/ml). Podem utilizar-se outros marcadores de citotoxicidade, tais como a 7-aminoactinomicina D (7-AAD), o azul de Trypan ou outros, desde que se possa demonstrar que produzem resultados semelhantes ao IP, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2.

Medição da citotoxicidade por citometria de fluxo e estimativa do valor CV75

19. O nível de fixação do IP é analisado por citometria de fluxo no canal FL-3. No total, são analisadas 10 000 células vivas (IP negativo). A viabilidade celular pode ser calculada pelo programa de análise do citómetro utilizando a equação indicada em baixo. Se a viabilidade celular for baixa, devem ser adquiridas, no máximo, 30 000 células, incluindo células mortas. Uma outra opção consiste em adquirir os dados durante um minuto após o início da análise.

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células adquiridas}} \times 100$$

O valor CV75 (ver ponto 13), isto é, a concentração que provoca 75 % de sobrevivência das células THP-1 (25 % de citotoxicidade), é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

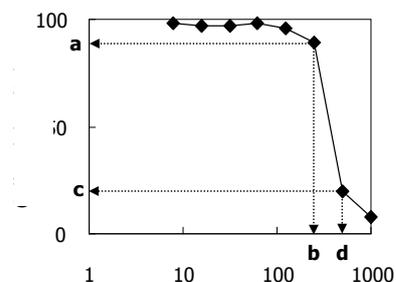
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

em que:

a é o valor mínimo de viabilidade celular superior a 75 %

c é o valor máximo de viabilidade celular inferior a 75 %

b e d são as concentrações que provocam os valores de viabilidade celular a e c, respetivamente



Podem utilizar-se outras abordagens para calcular o CV75, desde que fique demonstrado que tal não tem qualquer impacto nos resultados (por exemplo, testando as substâncias para demonstração de competência).

Medição da expressão de CD86/CD54

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

20. Utiliza-se o solvente/veículo adequado (solução salina, meio ou DMSO; ver o ponto 14) para dissolver os produtos químicos em estudo ou para criar uma dispersão estável. Os produtos químicos em estudo são primeiro diluídos até uma concentração correspondente a 100 vezes (na solução salina ou no meio) ou 500 vezes (no DMSO) o valor $CV75 \times 1,2$ determinado no *ensaio de determinação da dose* (ver ponto 19). Se o CV75 não puder ser determinado (ou seja, se a citotoxicidade observada no *ensaio de determinação da dose* for insuficiente), deve utilizar-se como concentração inicial a concentração solúvel ou em dispersão estável mais elevada do produto químico em estudo preparado com cada solvente/veículo. Note-se que a concentração final na placa não deve exceder 5 000 µg/ml (no caso da solução salina ou do meio) ou 1 000 µg/ml (no caso do DMSO). Seguidamente, são realizadas diluições em série de fator 1:2 utilizando o solvente/veículo correspondente para obter as soluções-mãe (oito concentrações entre $100 \times 1,2 \times CV75$ e $100 \times 0,335 \times CV75$ (na solução salina ou no meio) ou entre $500 \times 1,2 \times CV75$ e $500 \times 0,335 \times CV75$ (no DMSO)), que serão testadas de acordo com o método h-CLAT (ver o protocolo DB-ALM n.º 158 para um exemplo do esquema de dosagem). As soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 50 (solução salina ou meio) ou de 250 (DMSO) no meio de cultura (soluções de trabalho). Estas soluções de trabalho são finalmente utilizadas para exposição, após uma diluição final de fator 2 na placa. Se os resultados não satisfizerem os critérios de aceitação descritos nos pontos 29 e 30 quanto à viabilidade celular, pode repetir-se o ensaio de determinação da dose para deduzir um valor CV75 mais preciso. Note-se que apenas podem ser utilizadas placas de 24 poços para a medição da expressão de CD86/CD54.
21. O controlo do solvente/veículo é preparado conforme descrito no ponto 16. O controlo positivo utilizado no método h-CLAT é o DNCB (ver ponto 11), para o qual são preparadas soluções-mãe em DMSO e diluídas tal como descrito para as soluções-mãe no ponto 20. O DNCB deve ser utilizado como controlo positivo para a *medição da expressão de CD86/CD54* a uma concentração final única na placa (geralmente 4,0 µg/ml). Para obter uma concentração de 4,0 µg/ml de DNCB na placa, prepara-se uma solução-mãe de 2 mg/ml de DNCB em DMSO, que é depois novamente diluída por um fator de 250 no meio de cultura, até se obter uma solução de trabalho a 8 µg/ml. Em alternativa, pode utilizar-se o valor CV75 do DNCB, determinado em cada instalação de ensaio, como

concentração do controlo positivo. Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução. Para os controlos positivos, a concentração final única na placa não deve exceder 5 000 µg/ml (no caso da solução salina ou meio) ou 1 000 µg/ml (no caso do DMSO). Os critérios de aceitação para a execução são idênticos aos descritos para o produto químico em estudo (ver ponto 29), exceto no que diz respeito ao último critério, uma vez que o controlo positivo é testado a uma concentração única.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

22. Para obter uma previsão, é necessária uma experiência para cada produto químico em estudo e para cada substância de controlo. Cada experiência consiste em pelo menos duas execuções independentes para a *medição de expressão de CD86/CD54* (ver pontos 26 a 28). Cada execução independente é efetuada num dia diferente ou no mesmo dia, desde que, para cada execução: a) sejam preparadas soluções-mãe e de trabalho frescas, independentes, do produto químico em estudo e soluções de anticorpos, e b) sejam utilizadas células colhidas em dois tempos independentes (provenientes de frascos de cultura diferentes); no entanto, as células podem ser provenientes da mesma passagem. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo preparados como soluções de trabalho (500 µl) são misturados com 500 µl de suspensão de células (1×10^6 células) a um rácio de 1:1 e as células são incubadas durante $24 \pm 0,5$ horas, conforme descrito nos pontos 20 e 21. Em cada execução, basta um único replicado para cada concentração do produto química em estudo e da substância de controlo, dado que a previsão é obtida a partir de, pelo menos, duas execuções independentes.

Coloração celular e análise

23. Após $24 \pm 0,5$ horas de exposição, as células são transferidas da placa de 24 poços para tubos de ensaio e recolhidas por centrifugação, antes de serem lavadas duas vezes com 1 ml de tampão de coloração (se necessário, podem ser efetuadas etapas de lavagem suplementares). Após a lavagem, as células são bloqueadas com 600 µl de solução de bloqueio [tampão de coloração com 0,01 % (m/v) de globulina (fração Cohn II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ou equivalente)] e incubadas a 4 °C durante 15 minutos. Após o bloqueio, as células são divididas em três alíquotas de 180 µl numa placa de 96 poços de fundo redondo ou num microtubo.
24. Após centrifugação, as células são coradas a 4 °C durante 30 minutos com 50 µl de anticorpos marcados com FITC anti-CD86, anti-CD54 ou de ratinho (isótipo) IgG1. Os anticorpos descritos no protocolo DB-ALM n.º 158 h-CLAT (18) devem ser diluídos no tampão de coloração a um rácio de 3:25 v/v [para CD86 (BD-PharMingen, #555657;

Clone: Fun-1) ou de 3:50 v/v (para CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) e IgG1 (DAKO, #X0927)]. Estes rácios de dilui o dos anticorpos foram definidos aquando do desenvolvimento do ensaio como aqueles que apresentam a melhor rela o sinal/ruído. A experiência adquirida aquando do desenvolvimento do ensaio indica que a intensidade da fluorescência dos anticorpos   geralmente coerente entre diferentes lotes. No entanto, os utilizadores podem ponderar a possibilidade de proceder   titula o dos anticorpos em condi es laboratoriais próprias, a fim de definir as concentra es mais adequadas. Podem ser utilizados anticorpos anti-CD86 e/ou anti-CD54 marcados por outros fluorocromos, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos anticorpos conjugados por FITC, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2. Note-se que a altera o do clone ou do fornecedor dos anticorpos, tal como descrito no protocolo DB-ALM n.  158 h-CLAT (18), pode afetar os resultados. Após terem sido lavadas duas ou mais vezes com 150  l de tampão de colora o, as células são novamente colocadas em suspensão no tampão de colora o (por exemplo, 400  l), sendo acrescentada a soluço de IP (por exemplo, 20  l para obter uma concentra o final de 0,625  g/ml) ou um outro marcador de citotoxicidade (ver ponto 18). Os níveis de expressão de CD86 e de CD54 e a viabilidade celular são analisados por citometria de fluxo.

DADOS E RELATÓRIOS

Avalia o dos dados

25. O nível de expressão de CD86 e CD54   analisado por citometria de fluxo com o canal de aquisi o FL-1. Com base na média geométrica da intensidade de fluorescência (IMF, intensidade média de fluorescência), a intensidade relativa de fluorescência (IRF) de CD86 e de CD54 para as células com controlo (ctrl) positivo e para as células tratadas com o produto químico   calculada utilizando a seguinte equa o:

$$RFI = \frac{MFI \text{ c l. tratadas com prod. qu m.} - MFI \text{ c l. ctrl do isótipo tratadas com prod. qu m.}}{MFI \text{ c l. ctrl tratadas solvente/veículo} - MFI \text{ c l. ctrl isótipo tratadas solvente/veículo}} \times 100$$

A viabilidade celular das células de controlo (ctrl) do isótipo [coradas com anticorpos de ratinho IgG1 (isótipo)] também   calculada de acordo com a equa o descrita no ponto 19.

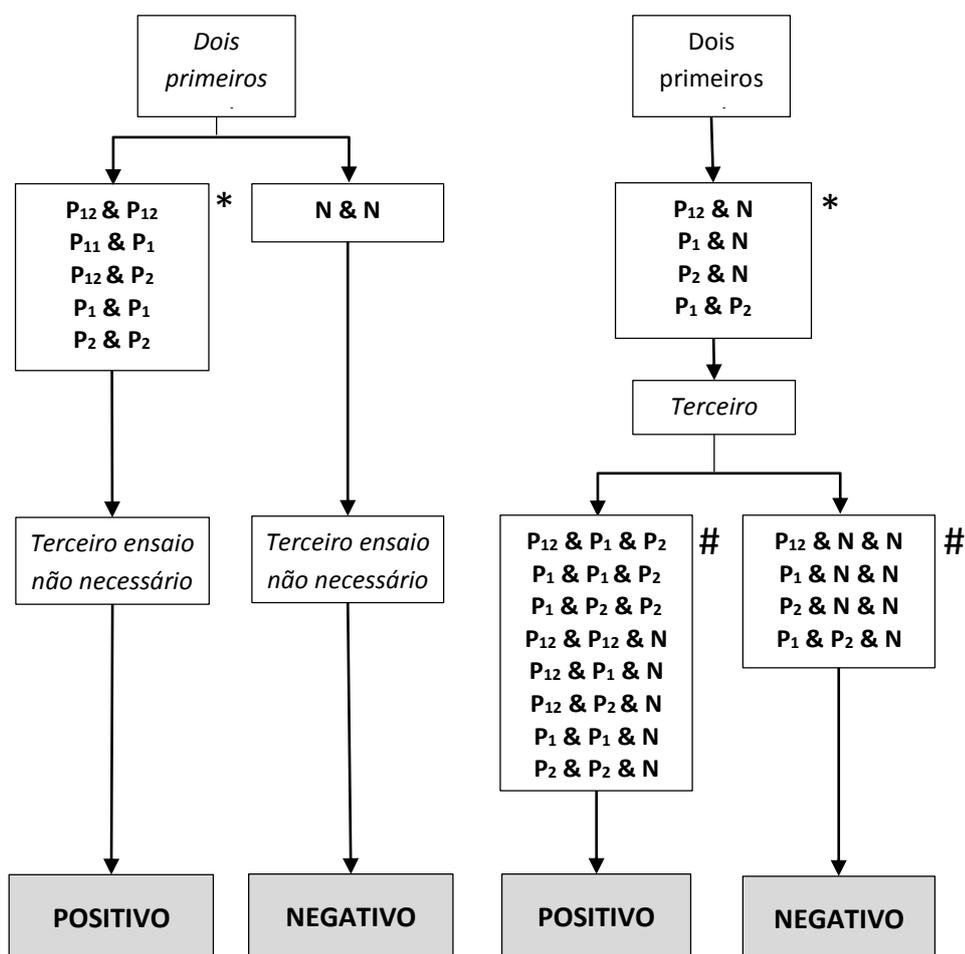
Modelo preditivo

26. Para determinar a expressão de *CD86/CD54*, cada produto químico em estudo   testado em, pelo menos, duas execu es independentes para obter uma previsão única (POSITIVA ou NEGATIVA). Uma previsão por h-CLAT   considerada POSITIVA se for preenchida pelo menos uma das seguintes condi es em duas de duas ou em pelo menos duas de três

execuções independentes; caso contrário, a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA (figura 1):

- A IRF de CD86 é igual ou superior a 150 % a qualquer concentração testada (com viabilidade celular ≥ 50 %);
 - A IRF de CD54 é igual ou superior a 200 % a qualquer concentração testada (com viabilidade celular ≥ 50 %).
27. Atendendo ao que precede, se as duas primeiras execuções forem ambas positivas para CD86 e/ou forem ambas positivas para CD54, a previsão por h-CLAT é considerada POSITIVA e não é necessário efetuar uma terceira execução. Do mesmo modo, se as duas primeiras execuções forem negativas para ambos os marcadores, a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA (tendo devidamente em conta o disposto no ponto 30), não sendo necessário efetuar uma terceira execução. Se, no entanto, as duas primeiras execuções não forem concordantes em relação a pelo menos um dos marcadores (CD54 ou CD86), é necessário realizar uma terceira execução e a previsão final basear-se-á no resultado obtido na maioria das três execuções individuais (ou seja, dois de três). A este respeito, importa notar que, se forem efetuadas duas execuções independentes e uma só for positiva para CD86 (a seguir designada P₁) e a outra só for positiva para CD54 (a seguir designada P₂), é necessário realizar uma terceira execução. Se esta terceira execução for negativa para ambos os marcadores (a seguir designada N), a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA. Em contrapartida, se a terceira execução for positiva para um dos marcadores (P₁ ou P₂) ou para ambos os marcadores (a seguir designada P₁₂), a previsão por h-CLAT é considerada POSITIVA.

Figura 1: Modelo preditivo usado no método h-CLAT. Uma previsão por h-CLAT deve ser analisada no âmbito de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral.



P₁: execução positiva apenas para CD86; P₂: execução positiva apenas para CD54; P₁₂: execução positiva para CD86 e CD54; N: execução não positiva para CD86 nem para CD54.

*As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das duas primeiras execuções, independentemente da ordem de obtenção dos resultados.

#As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das três execuções com base nos resultados obtidos nas duas primeiras execuções indicados na caixa acima, mas não refletem a ordem de obtenção dos resultados.

28. No caso dos produtos químicos em estudo que se prevê sejam POSITIVOS com o h-CLAT, podem determinar-se dois valores de concentração efetiva (CE), CE150 para CD86 e CE200 para CD54, ou seja, a concentração à qual os produtos químicos em estudo produzem uma IRF de 150 ou 200. Estes valores CE podem contribuir para a avaliação do

potencial de sensibilização (9) no âmbito de uma abordagem integrada do tipo IATA (4) (5) (6) (7) (8). Podem ser calculados utilizando as seguintes equações:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

em que

A_{conc} é a concentração mais baixa em $\mu\text{g/ml}$ com IRF > 150 (CD86) ou 200 (CD54)

B_{conc} é a concentração mais elevada em $\mu\text{g/ml}$ com IRF < 150 (CD86) ou 200 (CD54)

A_{IRF} é a IRF à concentração mais baixa com IRF > 150 (CD86) ou 200 (CD54)

B_{IRF} é a IRF à concentração mais elevada com IRF < 150 (CD86) ou 200 (CD54)

Para determinar de modo mais preciso os valores CE150 e CE200, podem ser necessárias três execuções independentes para a *medição da expressão de CD86/CD54*. Os valores CE150 e CE200 finais são, então, determinados como o valor mediano das CE calculado a partir das três execuções independentes. Se apenas duas das três execuções independentes satisfizerem os critérios de positividade (ver pontos 26 e 27), é adotado o valor CE150 ou CE200 mais elevado.

Critérios de aceitação

29. Os critérios de aceitação a seguir indicados devem ser respeitados ao utilizar o método h-CLAT (22) (27).
- Os valores de viabilidade celular dos controlos do meio e do solvente/veículo devem ser superiores a 90 %.
 - Para o controlo do solvente/veículo, as IRF de CD86 e de CD54 não devem exceder os critérios positivos (CD86 IRF \geq 150 % e CD54 IRF \geq 200 %). Os valores de IRF para o controlo do solvente/veículo são calculados utilizando a fórmula indicada no ponto 25 (substituindo a menção «IMF do produto químico» por «IMF do solvente/veículo» e «IMF do solvente/veículo» por «IMF do controlo (meio)»).
 - Para o controlo do meio e do solvente/veículo, os rácios da IMF CD86 e CD54 para o controlo de isótipo devem ser > 105 %.
 - Para o controlo positivo (DNCB), os valores IRF de CD86 e de CD54 devem cumprir os critérios positivos (CD86 IRF \geq 150 e CD54 IRF \geq 200) e a viabilidade celular deve ser superior a 50 %.

- Para o produto químico em estudo, a viabilidade celular deve ser superior a 50 % em, pelo menos, quatro concentrações testadas em cada execução.
30. Os resultados negativos só são aceitáveis no caso de produtos químicos em estudo que apresentem uma viabilidade celular inferior a 90 % à concentração mais elevada testada (ou seja, $1,2 \times CV75$ de acordo com o esquema de diluições em série descrito no ponto 20). Se a viabilidade celular a $1,2 \times CV75$ for igual ou superior a 90 %, o resultado negativo não deve ser tido em conta. Neste caso, é recomendável tentar aperfeiçoar a seleção das doses repetindo a determinação do valor CV75. Note-se que, quando uma concentração de 5 000 µg/ml na solução salina (ou no meio ou outros solventes/veículos), uma concentração de 1 000 µg/ml em DMSO ou a concentração solúvel mais elevada é utilizada como concentração máxima de ensaio para um produto químico em estudo, pode aceitar-se um resultado negativo mesmo que a viabilidade celular seja superior a 90 %.

Relatório de ensaio

31. O relatório de ensaio deve incluir as informações que a seguir se indicam.

Produto químico em estudo

Substância monocomponente

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, log P, solubilidade na água, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

- Aspeto físico, solubilidade na água, solubilidade em DMSO e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;
- Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Controlos

Controlo positivo

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, log P, água, solubilidade na água, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas e se aplicável;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação da execução, se aplicável.

Controlo negativo e controlo do solvente/veículo

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes caso seja utilizado um solvente/veículo diferente dos mencionados nas orientações de ensaio, na medida em que estejam disponíveis;
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

- Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;
- Descrição do ensaio utilizado;
- Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);
- Citometria de fluxo utilizada (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, globulina, anticorpos e marcador de citotoxicidade utilizados;
- O procedimento utilizado para demonstrar a competência do laboratório na realização do ensaio, mediante o teste de substâncias para demonstração de competência, e o procedimento utilizado para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo, por exemplo dados históricos do controlo e/ou dados históricos dos controlos de reatividade.

Critérios de aceitação do ensaio

- Viabilidade celular, valores IMF e IRF obtidos com o controlo do solvente/veículo comparativamente com os intervalos de aceitação;
- Viabilidade celular e valores IRF obtidos com o controlo positivo comparativamente com os intervalos de aceitação;
- Viabilidade celular de todas as concentrações testadas do produto químico em estudo.

Procedimento de ensaio

- Número de execuções realizadas;
- Concentrações do produto químico em estudo, aplicação e tempo de exposição utilizado (se diferente do recomendado);
- Duração da exposição (se diferente da recomendada);
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

- Quadro com os dados, incluindo o valor CV75 (se aplicável), a IMF geométrica individual, a IRF, valores de viabilidade celular, valores CE150/CE200 (se aplicável) obtidos para o produto químico em estudo e para o controlo positivo em cada execução,

bem como uma indicação da classificação do produto químico em estudo segundo o modelo preditivo;

- Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o método h-CLAT;
- Análise dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso estejam disponíveis outras informações pertinentes.

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Disponível em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization

hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Disponivel em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Disponivel em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kollé S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.

- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Disponível em: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, França, 2005, 96 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Apêndice 1.1

DEFINIÇÕES

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (21).

AOP (*Adverse Outcome Pathway – via determinante dos efeitos nocivos*): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (22).

Produto químico: Uma substância ou mistura.

CV75: Concentração estimada que apresenta uma viabilidade celular de 75 %.

CE150: Concentrações que apresentam IRF de 150 para a expressão de CD86.

CE200: Concentrações que apresentam IRF de 200 para a expressão de CD54.

Citometria de fluxo: Técnica citométrica em que células em suspensão num fluido passam, uma a uma, por um foco de excitação luminosa, disperso em padrões característicos das células e dos seus componentes; as células são frequentemente marcadas com marcadores fluorescentes para que a luz seja primeiro absorvida e depois emitida a uma frequência diferente.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment – abordagem integrada de ensaio e avaliação*): Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

Controlo do meio: Replicado não tratado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio. Esta amostra é tratada com amostras tratadas com o produto químico em estudo e outras amostras de controlo, para determinar se o solvente/veículo interage com o sistema

de ensaio.

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

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

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

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Intensidade relativa de fluorescência (IRF): Valores relativos da média geométrica da intensidade de fluorescência (IMF) das células tratadas com o produto químico em comparação com a IMF das células tratadas com o solvente/veículo.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (21).

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (21).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo em simultâneo com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (21).

Tampão de coloração: Uma solução salina de tampão fosfato com 0,1 % de albumina de soro bovino.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/veículo interage com o sistema de ensaio.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (21).

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

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

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (23).

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

Ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido (21).

Apêndice 1.2**SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA**

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo corretamente a previsão esperada com o método h-CLAT para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores CV75, CE150 e CE200 que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem o conjunto de respostas possíveis no que diz respeito aos perigos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o método h-CLAT. Além disso, estão disponíveis dados de referência publicados para o método h-CLAT (3) (14).

Quadro 1: Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o método h-CLAT

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão <i>in vivo</i> ¹	Intervalo de referência CV75 em µg/ml ²	Resultados h-CLAT para CD86 (intervalo de referência CE150 em µg/ml) ²	Resultados h-CLAT para CD54 (intervalo de referência CE200 em µg/ml) ²
2,4-Dinitroclorobenzeno	97-00-7	Sólido	Sensibilizante (extremo)	2-12	Positivo (0,5-10)	Positivo (0,5-15)
4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	Sensibilizante (forte)	5-95	Positivo (< 40)	Negativo (> 1,5) ³
Sulfato de níquel	10101-97-0	Sólido	Sensibilizante (moderado)	30-500	Positivo (< 100)	Positivo (10-100)
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sólido	Sensibilizante (moderado)	30-400	Negativo (> 10) ³	Positivo (10-140)
R(+)-Limoneno	5989-27-5	Líquido	Sensibilizante (fraco)	> 20	Negativo (> 5) ³	Positivo (< 250)
Imidazolidinilureia	39236-46-9	Sólido	Sensibilizante (fraco)	25-100	Positivo (20-90)	Positivo (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Não sensibilizante	> 5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Glicerol	56-81-5	Líquido	Não sensibilizante	> 5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	Não sensibilizante	1 500-5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Ácido 4-aminobenzoico	150-13-0	Sólido	Não sensibilizante	> 1 000	Negativo (> 1 000)	Negativo (> 1 000)

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

¹ A previsão de perigo (e potência) *in vivo* baseia-se em dados LLNA (3) (14). A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (24).

² Com base em valores históricos observados (13) (25).

³ Historicamente, a maioria dos resultados negativos foi obtida para este marcador, pelo que se espera, em grande parte, um resultado negativo. O intervalo indicado foi definido com base nos poucos resultados positivos históricos observados. Se for obtido um resultado positivo, o valor CE deve situar-se dentro do intervalo de referência indicado.

Apêndice 2

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: TESTE DE ATIVAÇÃO DA LINHA CELULAR U937 (U-SENS™)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. O método de ensaio U-SENS™ permite quantificar as variações na expressão de um marcador de superfície celular associadas ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas (ou seja, CD86), na linha celular do linfoma histiocítico humano U937, após a exposição a sensibilizantes (1). Os níveis de expressão medidos para o marcador de superfície celular CD86 na linha celular U937 são, em seguida, utilizados para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.
2. O método de ensaio U-SENS™ foi avaliado num estudo de validação (2) coordenado pela L'Oréal, seguido de uma análise independente pelos pares conduzida pelo Comité Científico Consultivo (ESAC) do Laboratório de Referência da União Europeia para as Alternativas à Experimentação em Animais (EURL ECVAM) (3). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o método de ensaio U-SENS™ foi recomendado pelo EURL ECVAM (4) para ser utilizado no âmbito de uma IATA para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. No seu documento de orientação relativo à elaboração de relatórios sobre as abordagens estruturadas de integração de dados e de utilização de fontes individuais de informação no âmbito de uma IATA para a sensibilização cutânea, a OCDE analisa atualmente vários estudos de casos que descrevem diferentes estratégias de ensaio e modelos preditivos. Uma das diferentes abordagens definidas baseia-se no ensaio U-SENS (5). Encontram-se na literatura (4) (5) (7) exemplos da utilização de dados U-SENS™ combinados com outras informações, incluindo dados históricos e dados humanos válidos (6).
3. O método de ensaio U-SENS™ demonstrou ser transferível para laboratórios com experiência em técnicas de cultura celular e análise por citometria de fluxo. O nível de reprodutibilidade esperado das previsões efetuadas pelo ensaio é da ordem dos 90 % intralaboratorial e 84 % interlaboratorial (8). Os resultados do estudo de validação (8) e de outros estudos publicados (1) indicam, em termos gerais, que, em comparação com os resultados obtidos pelo método LLNA, a precisão na distinção entre sensibilizantes cutâneos (cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 86 % (N=166), com uma sensibilidade de 91 % (118/129) e uma especificidade de 65 % (24/37). Em comparação com os resultados obtidos no ser humano, a precisão na distinção entre sensibilizantes

(cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 77 % (N=101), com uma sensibilidade de 100 % (58/58) e uma especificidade de 47 % (20/43). É mais provável que os falsos negativos nas previsões efetuadas com o método U-SENS™ em comparação com o LLNA digam respeito a produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo a moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que a produtos químicos com um potencial de sensibilização cutânea elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (1) (8) (9). No seu conjunto, estas informações demonstram a utilidade do método U-SENS™ para a identificação dos perigos de sensibilização cutânea. No entanto, os valores relativos à precisão do ensaio U-SENS™ utilizado isoladamente são meramente indicativos, uma vez que este método deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a situação no ser humano.

4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o método U-SENS™ é aplicável a produtos químicos em estudo (incluindo ingredientes cosméticos, tais como conservantes, tensoativos, substâncias ativas, corantes) abrangendo diversos grupos funcionais orgânicos, propriedades físico-químicas, potência de sensibilização cutânea (tal como determinadas por estudos *in vivo*) e o espectro de mecanismos de reação que se sabe estarem associados à sensibilização cutânea (ou seja, aceitador de Michael, formação de base de Schiff, agente acilante, substituição nucleófila bimolecular [SN2] ou substituição nucleófila aromática [SNAr]) (1) (8) (9) (10). O método de ensaio U-SENS™ é aplicável a produtos químicos que sejam solúveis ou que formem uma dispersão estável (ou seja, um coloide ou uma suspensão em que o produto químico não se deposite nem se separe do solvente/veículo formando diferentes fases) num solvente/veículo adequado (ver ponto 13). Os produtos químicos constantes da base de dados assinalados como pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação) ou pró-haptenos (substâncias que requerem ativação enzimática, por exemplo através de enzimas P450) foram corretamente previstos pelo ensaio U-SENS™ (1) (10). As substâncias capazes de provocar a rutura de membranas podem produzir resultados falsos positivos, devido a um aumento não específico da expressão de CD86. Com efeito, três dos sete falsos positivos em relação à classificação de referência *in vivo* eram tensoativos (1). Por isso, os resultados positivos com tensoativos devem ser tratados com prudência, enquanto os resultados negativos com tensoativos podem continuar a ser utilizados para apoiar a identificação do produto químico em estudo como não sensibilizante. É possível avaliar produtos químicos em estudo fluorescentes com o U-SENS™ (1). No entanto, os produtos fortemente fluorescentes que emitem no mesmo comprimento de onda que o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou que o iodeto

de propídio (IP) provocam interferência com a detecção por citometria de fluxo, pelo que não podem ser corretamente avaliados utilizando anticorpos conjugados com FITC (potenciais falsos negativos) ou IP (viabilidade não mensurável). Neste caso, é possível recorrer, respetivamente, a outros anticorpos marcados com fluorocromos ou a outros marcadores de citotoxicidade, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos dos anticorpos marcados com FITC ou com IP (ver ponto 18), por exemplo testando as substâncias para demonstração de competência indicadas no apêndice 2.2. À luz do que precede, os resultados positivos com tensioativos e os resultados negativos com produtos químicos em estudo fortemente fluorescentes devem ser interpretados no contexto das limitações indicadas e em conjunto com outras fontes de informação no âmbito da IATA. Nos casos em que seja demonstrado que o ensaio U-SENS™ não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, este ensaio não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

5. Tal como descrito acima, o ensaio U-SENS™ ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. No entanto, quando utilizado no âmbito de abordagens integradas do tipo IATA, pode também contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização. Contudo, é necessário continuar a trabalhar, de preferência com base em dados humanos, para determinar o modo como os resultados do U-SENS™ poderão vir a ser úteis para este tipo de avaliação.
6. Apresentam-se definições no apêndice 2.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O método U-SENS™ é um ensaio *in vitro* que permite quantificar as variações da expressão do marcador de superfície celular CD86 numa linha celular do linfoma histiocítico humano – as células U937– após uma exposição de 45 ± 3 horas ao produto químico em estudo. O marcador de superfície CD86 é um marcador típico de ativação das células U937. Trata-se de uma molécula de coestimulação conhecida por ser capaz de simular a ativação monocitária, o que desempenha um papel crítico na ativação das células T. As variações na expressão do marcador de superfície celular CD86 são medidas por citometria de fluxo após coloração das células, geralmente com anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A citotoxicidade é medida em paralelo (por exemplo, utilizando IP), a fim de determinar se a ativação da expressão do marcador de superfície celular CD86 ocorre a concentrações subcitotóxicas. O índice de estimulação (IE) do marcador de superfície celular CD86, em comparação com o do controlo do solvente/veículo, é calculado e utilizado no modelo preditivo (ver ponto 19) para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

8. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 2.2, em conformidade com as boas práticas para os métodos *in vitro* (11). Além disso, os utilizadores do ensaio devem manter uma base de dados históricos dos controlos de reatividade (ver ponto 11), obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 15 e 16), e utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório é mantida ao longo do tempo.

PROCEDIMENTO

9. O presente método de ensaio baseia-se no protocolo n.º 183 do serviço de base de dados sobre os métodos alternativos à experimentação em animais (DB-ALM — *DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation*) U-SENS™ (12). Devem utilizar-se procedimentos operacionais normalizados (PON) aquando da implementação e utilização do método de ensaio U-SENS™ em laboratório. Pode utilizar-se um sistema automatizado para executar o método de ensaio U-SENS™ se for possível demonstrar que produz resultados semelhantes, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. Segue-se uma descrição dos principais elementos e procedimentos do método U-SENS™.

Preparação das células

10. Para a realização do ensaio U-SENS™, deve utilizar-se a linha celular do linfoma histiocítico humano, U937 (13). As células (clone CRL1593.2) devem ser obtidas junto de um banco de células reconhecido, como a American Type Culture Collection.
11. As células U937 são cultivadas a 37 °C numa atmosfera humidificada a 5 % CO₂, em meio RPMI-1640 complementado com 10 % de soro fetal de vitelo (SFV), 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (meio completo). As células U937 são passadas regularmente a cada 2-3 dias a uma densidade de 1,5 ou 3 × 10⁵ células/ml, respetivamente. A densidade celular não deve exceder 2 × 10⁶ células/ml e a viabilidade celular medida pela exclusão do azul de Trypan deve ser ≥ 90 % (não deve aplicar-se na primeira passagem após descongelação). Antes de ser utilizado para o ensaio, cada lote de células, de SFV ou de anticorpos deve ser qualificado mediante a realização de um controlo de reatividade. O controlo de reatividade das células deve ser efetuado com o controlo positivo, o ácido picrilsulfónico (ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico: TNBS) (n.º CAS 2508-19-2, pureza ≥ 99 %) e com o

controle negativo, o ácido láctico (n.º CAS 50-21-5, pureza $\geq 85\%$), pelo menos uma semana após a descongelação. O controle de reatividade deve ser efetuado com seis concentrações finais para cada um dos dois controles (TNBS: 1, 12.5, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$ e ácido láctico: 1, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$). O TNBS dissolvido no meio completo deve produzir uma resposta positiva para o CD86, relacionada com a concentração (por exemplo, quando uma concentração positiva, IE CD86 ≥ 150 , é seguida por uma concentração com um IE CD86 crescente); o ácido láctico dissolvido no meio completo deve produzir uma resposta negativa para o CD86 (ver ponto 21). Apenas devem ser utilizados para o ensaio os lotes de células que tenham passado duas vezes o controle de reatividade. As células podem ser propagadas até sete semanas após a descongelação. O número de passagens não deve exceder 21. O controle de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 18 a 22.

12. Para o ensaio, as células U937 são inoculadas a uma densidade de 3×10^5 células/ml ou 6×10^5 células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante dois dias ou um dia, respetivamente. Podem utilizar-se condições de pré-cultura diferentes das descritas acima, desde que a escolha seja suficientemente fundamentada do ponto de vista científico e seja possível demonstrar que produz resultados semelhantes, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são novamente colocadas em suspensão num meio de cultura fresco a uma densidade de 5×10^5 células/ml. Em seguida, distribuem-se as células numa placa de 96 poços de fundo plano com 100 μl (densidade celular final de $0,5 \times 10^5$ células/poço).

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

13. A avaliação da solubilidade deve ser efetuada antes do ensaio. Para este efeito, os produtos químicos em estudo são dissolvidos ou dispersos de forma estável a uma concentração de 50 mg/ml, escolhendo de preferência como solvente o meio completo ou, como segunda opção de solvente/veículo, o dimetilsulfóxido (DMSO, pureza $\geq 99\%$), se o produto químico em estudo não for solúvel no meio completo. Para o ensaio, dissolve-se o produto químico em estudo até uma concentração final de 0,4 mg/ml no meio completo, se o produto químico for solúvel neste solvente/veículo. Se apenas for solúvel em DMSO, é dissolvido a uma concentração de 50 mg/ml. É possível utilizar solventes/veículos diferentes dos descritos, desde que a escolha seja fundamentada do ponto de vista científico. Deve ser tida em conta a estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo final.
14. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. Uma vez que não é realizado um ensaio de determinação da dose, devem testar-se,

para a primeira execução, seis concentrações finais (1, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml) no solvente/veículo correspondente, quer no meio completo, quer em DMSO a 0,4 % no meio. Para as execuções seguintes, partindo das soluções do produto químico em estudo a uma concentração de 0,4 mg/ml em meio completo, ou de 50 mg/ml em DMSO, preparam-se pelo menos quatro soluções de trabalho (ou seja, pelo menos quatro concentrações) utilizando o solvente/veículo correspondente. Para terminar, as soluções de trabalho são utilizadas para o tratamento, acrescentando um volume igual de células U937 em suspensão (ver ponto 11 *supra*) ao volume da solução de trabalho na placa para obter uma diluição suplementar de fator 2 (12). As concentrações (pelo menos quatro) para eventuais execuções suplementares são selecionadas com base nos resultados individuais de todas as execuções anteriores (8). As concentrações finais utilizáveis são 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µg/ml. A concentração final máxima é de 200 µg/ml. Se for obtido um valor positivo para CD86 a 1 µg/ml, convém avaliar 0,1 µg/ml para encontrar a concentração do produto químico em estudo que não transpõe o limiar de positividade de CD86. Para cada execução, calcula-se o valor CE150 (concentração à qual um produto químico atinge o limiar de positividade de 150 % para CD86, ver ponto 19) se for observada uma resposta positiva para CD86 dependente da concentração. Se o produto químico em estudo induzir uma resposta positiva para CD86 não relacionada com a concentração, o cálculo do valor CE150 pode não ser pertinente, tal como descrito no protocolo DB-ALM n.º 183 U-SENS™ (12). Para cada execução, é calculado, sempre que possível, o valor CV70 (concentração à qual um produto químico atinge o limiar de citotoxicidade de 70 %, ver ponto 19) (12). Para avaliar o efeito de resposta ligada à concentração do aumento de CD86, quaisquer concentrações escolhidas entre as concentrações utilizáveis devem ser repartidas uniformemente entre a CE150 (ou a concentração mais elevada não citotóxica negativa para CD86) e a CV70 (ou a concentração mais elevada permitida, ou seja, de 200 µg/ml). Para efeitos de comparação, devem testar-se, no mínimo, quatro concentrações por execução sendo, pelo menos, duas concentrações comuns à execução ou execuções anteriores.

15. O controlo do solvente/veículo utilizado no ensaio U-SENS™ é o meio completo – para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável, ver ponto 4 – ou o DMSO a 0,4 % em meio completo – para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável em DMSO.
16. O controlo positivo utilizado no ensaio U-SENS™ é o TNBS (ver ponto 11), preparado em meio completo. O TNBS deve ser utilizado como controlo positivo para a medição da expressão de CD86 a uma concentração final única na placa (50 µg/ml) que produza uma viabilidade celular > 70 %. Para obter uma concentração de 50 µg/ml de TNBS na placa,

prepara-se uma solução-mãe de TNBS a 1 M (ou seja, 293 mg/ml) em meio completo, antes de proceder a uma diluição por um fator de 2930 no meio completo até se obter uma solução de trabalho a 100 µg/ml. O ácido láctico (AL, CAS 50-21-5) deve ser utilizado como controlo negativo, dissolvido a 200 µg/ml no meio completo, a partir de uma solução-mãe a 0,4 mg/ml. Em cada placa de cada execução, preparam-se três replicados de meio completo controlo não tratado, o controlo do solvente/veículo e os controlos negativo e positivo (12). Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução. Os critérios de aceitação da execução são idênticos aos descritos para o produto químico em estudo (ver ponto 12).

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

17. O controlo do solvente/veículo ou as soluções de trabalho descritas nos pontos 14 a 16 são misturados na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões de células preparadas na placa de 96 poços de fundo plano (ver ponto 12). As placas tratadas são, em seguida, incubadas durante 45 ± 3 horas a 37°C , 5 % CO_2 . Antes da incubação, as placas são seladas com uma membrana semipermeável, para evitar a evaporação de produtos químicos em estudo voláteis e a contaminação cruzada entre células tratadas com os produtos químicos em estudo (12).

Coloração celular

18. Após 45 ± 3 horas de exposição, as células são transferidas para uma placa de microtitulação de fundo cónico e recolhidas por centrifugação. A interferência de solubilidade é definida pela presença de cristais ou gotas visíveis ao microscópio 45 ± 3 horas após o tratamento (antes da coloração celular). Os sobrenadantes são rejeitados e as restantes células são lavadas uma vez com 100 µl de um tampão fosfato salino (TFS) gelado contendo 5 % de soro fetal de vitelo (tampão de coloração). Após centrifugação, as células são novamente colocadas em suspensão em 100 µl de tampão de coloração e coradas com 5 µl (ou seja, 0,25 µg) de anticorpos anti-CD86 ou anticorpos de ratinho (isótipo) IgG1 marcados com FITC a 4°C durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Devem utilizar-se os anticorpos descritos no protocolo DB-ALM n.º 183 U-SENS™ (12) (para CD86: BD-PharMingen #555657 Clone: Fun-1, ou Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63; e para IgG1: BD-PharMingen #555748, ou Caltag/Invitrogen # GM4992). A experiência adquirida aquando do desenvolvimento do ensaio indica que a intensidade da fluorescência dos anticorpos é geralmente coerente entre diferentes lotes. É possível utilizar para o ensaio outros clones ou fornecedor dos anticorpos que tenham passado o controlo de reatividade (ver o ponto 11). No entanto, os utilizadores podem ponderar a possibilidade de proceder à titulação dos anticorpos em condições laboratoriais próprias, a

fim de definir a concentração mais adequada. Podem utilizar-se outros sistemas de detecção, por exemplo anticorpos anti-CD86 marcados por outros fluorocromos, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos anticorpos conjugados por FITC, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. Após duas lavagens com 100 µl de tampão de coloração e uma lavagem com 100 µl de TFS gelado, as células são novamente colocadas em suspensão em TFS gelado (por exemplo, 125 µl para as amostras a analisar manualmente tubo a tubo, ou 50 µl para uma placa de auto-amostragem) e acrescenta-se a solução de IP (concentração final: 3 µg/ml). Podem utilizar-se outros marcadores de citotoxicidade, tais como a 7-aminoactinomicina D (7-AAD) ou o azul de Trypan, desde que se possa demonstrar que produzem resultados semelhantes ao IP, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2.

Análise por citometria de fluxo

19. O nível de expressão de CD86 e a viabilidade celular são analisados por citometria de fluxo. As células são dispostas num gráfico de pontos à escala logarítmica de acordo com o seu tamanho (FSC) e granularidade (CSS), a fim de identificar claramente a população numa primeira janela R1 e eliminar os resíduos. O objetivo consiste em adquirir 10 000 células na janela R1 para cada poço. As células pertencentes a uma mesma janela R1 são representadas num gráfico de pontos FL3 ou FL4/CSS. As células viáveis são identificadas traçando uma segunda janela R2 de seleção da população celular negativa para o iodeto de propídio (canais FL3 ou FL4). Pode calcular-se a viabilidade celular pelo programa de análise do citómetro utilizando a equação indicada em baixo. Se a viabilidade celular for baixa, devem ser adquiridas, no máximo, 20 000 células, incluindo células mortas. Uma outra opção consiste em adquirir os dados durante um minuto após o início da análise.

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células adquiridas}} \times 100$$

A percentagem das células FL1-positivas é, em seguida, medida entre as células viáveis retidas em R2 (dentro de R1). A expressão de CD86 na superfície celular é analisada através de um gráfico de pontos FL1/CSS em células viáveis (R2).

No caso dos poços que contêm meio completo/IgG1, o marcador de análise é fixado próximo da população principal, de modo a que os controlos em meio completo apresentem um valor IgG1 na zona alvo de 0,6 a 0,9 %.

A interferência de cor é definida como uma transferência da dispersão correspondente aos IgG1 marcados com FITC (média geométrica de IE IgG1 FL1 \geq 150 %).

O índice de estimulação (IE) de CD86 para as células de controlo (não tratadas ou em DMSO a 0,4 %) e para as células tratadas com produtos químicos é calculado pela seguinte equação:

$$S. I. = \frac{\% \text{ de células tratadas } CD86^+ - \% \text{ de células tratadas } IgG1^+}{\% \text{ de células de controlo } CD86^+ - \% \text{ de células de controlo } IgG1^+} \times 100$$

% de células de controlo não tratadas IgG1⁺: percentagem de células FL1-positivas reconhecidas pelo IgG1 que ultrapassam o marcador de análise (intervalo de aceitação $\geq 0,6\%$ e $< 1,5\%$, ver ponto 22) entre as células viáveis não tratadas.

% de células de controlo IgG1⁺/células tratadas CD86⁺: percentagem de células FL1-positivas reconhecidas pelo IgG1/CD86 medida sem deslocar o marcador de análise, entre as células viáveis de controlo/tratadas.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

20. Os parâmetros seguintes são calculados no ensaio U-SENSTM: valor CV70, isto é, a concentração que produz uma sobrevivência de 70 % das células U937 (30 % de citotoxicidade) e o valor CE150, ou seja, a concentração à qual os produtos químicos em estudo induzem um índice de estimulação (IE) de CD86 de 150 %.

O valor CV70 é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

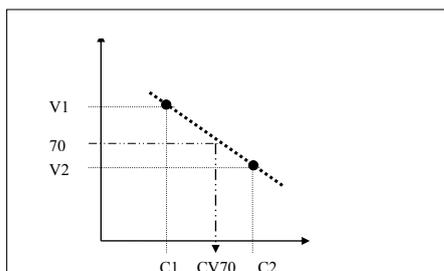
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

em que:

V1 é o valor mínimo de viabilidade celular superior a 70 %

V2 é o valor máximo de viabilidade celular inferior a 70 %

C1 e C2 são as concentrações que provocam os valores de viabilidade celular V1 e V2, respetivamente.



Podem ser utilizadas outras abordagens para calcular o valor CV70, desde que fique

demonstrado que tal não tem qualquer impacto nos resultados – por exemplo, testando as substâncias para demonstração de competência.

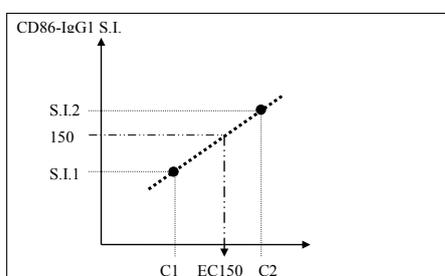
O valor CE150 é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

$$CE150 = C1 + [(150 - IE 1) / (IE 2 - IE 1) * (C2 - C1)]$$

Em que:

C1 é a concentração mais elevada em µg/ml com um IE CD86 < 150 % (IE 1)

C2 é a concentração mais baixa em µg/ml com um IE CD86 ≥ 150 % (IE 2)



Os valores CE150 e CV70 são calculados

- para cada execução: os valores CE150 e CV70 são utilizados como ferramentas para investigar o efeito de resposta ligada à concentração do aumento de CD86 (ver ponto 14);
- o valor CV70 global é determinado em função da viabilidade média (12);
- o valor CE150 global de um produto químico em estudo que se preveja POSITIVO com o ensaio U-SENS™ é determinado em função dos valores médios de IE CD86 (ver ponto 21) (12).

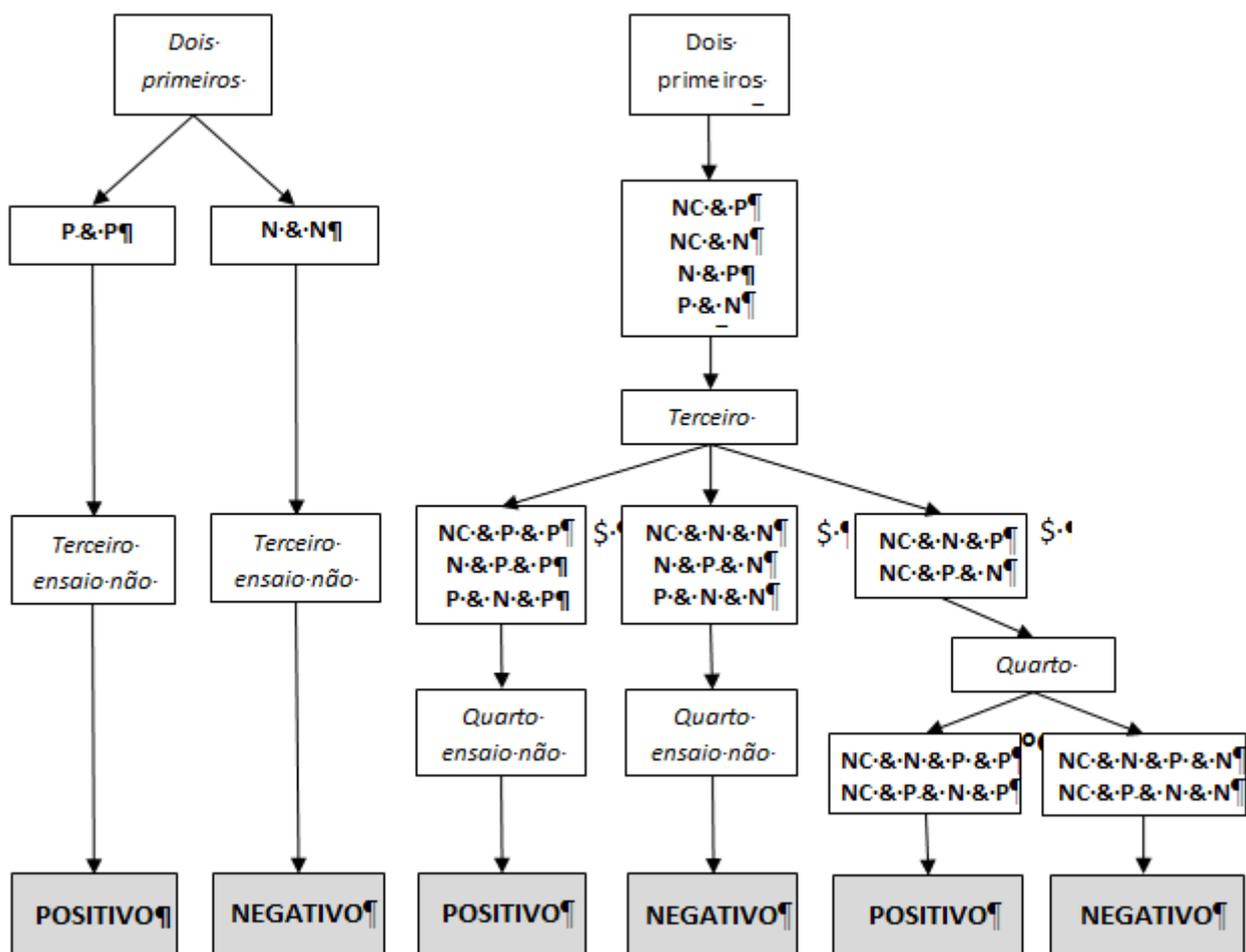
Modelo preditivo

21. Para a medição de expressão CD86, cada produto químico em estudo é testado em, pelo menos, quatro concentrações e em, pelo menos, duas execuções independentes (efetuadas em dias diferentes) para chegar a uma previsão única (NEGATIVO ou POSITIVO).
 - A conclusão individual de uma execução do ensaio U-SENS™ é considerada negativa (a seguir designada por N) se o IE de CD86 for inferior a 150 % a todas as concentrações não citotóxicas (viabilidade celular ≥ 70 %) e se não for observada nenhuma interferência (citotoxicidade, solubilidade: ver ponto 18, ou cor: ver ponto 19, independentemente das concentrações não citotóxicas às quais a interferência é detetada). Em todos os outros casos (para um IE de CD86 superior ou igual a 150 % e/ou interferências observadas), a

conclusão individual de uma execução do ensaio U-SENS™ é considerada positiva, sendo a seguir designada por P.

- Uma previsão U-SENS™ é considerada NEGATIVA se, pelo menos, duas execuções independentes forem negativas (N) (figura 1). Se as duas primeiras execuções forem negativas (N), a previsão U-SENS™ é considerada NEGATIVA e não é necessário proceder a uma terceira execução.
- Uma previsão U-SENS™ é considerada POSITIVA se, pelo menos, duas execuções independentes forem positivas (P) (figura 1). Se as duas primeiras execuções forem positivas (P), a previsão U-SENS™ é considerada POSITIVA e não é necessário proceder a uma terceira execução.
- Uma vez que não é realizado um ensaio de determinação da dose, há uma exceção se, na primeira execução, o IE de CD86 for superior ou igual a 150 % apenas à concentração não citotóxica mais elevada. Neste caso, a execução é considerada INCONCLUSIVA (NC), devendo testar-se, em execuções suplementares, concentrações adicionais (entre a concentração mais elevada não citotóxica e a concentração mais baixa citotóxica — ver ponto 20). Se uma execução for identificada como NC, convém realizar pelo menos duas execuções suplementares, e uma quarta execução caso os resultados das execuções 2 e 3 não sejam concordantes (N e/ou P, a título independente) (figura 1). As execuções seguintes serão consideradas positivas mesmo que apenas uma das concentrações não citotóxicas dê um valor de CD86 superior ou igual a 150 %, uma vez que os parâmetros de concentração foram adaptados especificamente a este produto químico em estudo. A previsão final basear-se-á no resultado maioritário das três ou quatro execuções individuais (ou seja, 2 de 3 ou 2 de 4) (figura 1).

Figura 1: Modelo preditivo utilizado no ensaio U-SENS™. Uma previsão por U-SENS™ deve ser considerada no âmbito de uma IATA e em conformidade com o disposto no ponto 4 e nos pontos 7, 8 e 9 da Introdução Geral.



N: Execução sem resultado positivo para CD86 nem interferência observada.

P: Execução com resultado positivo para CD86 e/ou interferência(s) observada(s).

NC: Inconclusivo. Primeira execução inconclusiva se CD86 for positivo apenas à concentração não citotóxica mais elevada.

#: Um resultado individual inconclusivo (NC) atribuído apenas aquando da primeira execução requer automaticamente uma terceira execução para chegar a uma maioria de conclusões positivas (P) ou negativas (N) em pelo menos duas de três execuções independentes.

§: As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das três execuções com base nos resultados obtidos nas duas primeiras execuções indicados na caixa acima.

º: As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das quatro execuções com base nos resultados obtidos nas três primeiras execuções indicados na caixa acima.

Critérios de aceitação

22. Ao utilizar o método de ensaio U-SENS™ devem respeitar-se os critérios de aceitação a seguir indicados (12).

- Após uma exposição de 45 ± 3 horas, a viabilidade média dos três replicados de células U937 não tratadas deve ser $> 90 \%$ e não deve observar-se qualquer deriva da expressão de CD86. A expressão basal de CD86 nas células U937 não tratadas deve estar compreendida entre $\geq 2 \%$ e $\leq 25 \%$.
- Se o solvente utilizado for o DMSO, a sua validade como controlo do veículo é avaliada calculando o IE do DMSO em comparação com o das células não tratadas, devendo a viabilidade média dos três replicados de células ser $> 90 \%$. O controlo de veículo DMSO é válido se o IE médio de CD86 nos três replicados de DMSO for inferior a 250% do IE médio de CD86 nos três replicados de células U937 não tratadas.
- As execuções são consideradas válidas se, pelo menos, dois dos três valores IgG1 das células U937 não tratadas forem $\geq 0,6 \%$ e $< 1,5 \%$.
- O controlo negativo testado em paralelo (ácido láctico) é considerado válido se, pelo menos, dois dos três replicados forem negativos (IE CD86 $< 150 \%$) e não citotóxicos (viabilidade celular $\geq 70 \%$).
- O controlo positivo (TNBS) é considerado válido se pelo menos dois dos três replicados forem positivos (IE CD86 $\geq 150 \%$) e não citotóxicos (viabilidade celular $\geq 70 \%$).

Relatório de ensaio

23. O relatório de ensaio deve incluir as informações indicadas a seguir.

Produto químico em estudo

Substância monocomponente

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, solubilidade no meio completo, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;
- Aspeto físico, solubilidade no meio completo, solubilidade em DMSO e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;
- Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Controlos

Controlo positivo

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas, se conhecidas e se pertinente;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação da execução, se aplicável.

Controlo negativo e controlo do solvente/veículo

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas pertinentes, caso seja utilizado um solvente/veículo diferente dos mencionados nas orientações de ensaio, na medida em que estejam disponíveis;
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

- Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;
- Descrição do método de ensaio utilizado;
- Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);
- Citometria de fluxo utilizada (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, anticorpos e marcador de citotoxicidade utilizados;
- Procedimento utilizado para demonstrar as competências do laboratório na realização do ensaio, mediante o teste de substâncias para demonstração de competência, e procedimento utilizado para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo, por exemplo dados históricos do controlo e/ou dados históricos dos controlos de reatividade.

Critérios de aceitação do ensaio

- Viabilidade celular e valores IE CD86 obtidos com o controlo do solvente/veículo, em comparação com os intervalos de aceitação;
- Viabilidade celular e valores IE obtidos com o controlo positivo, em comparação com os intervalos de aceitação;
- Viabilidade celular de todas as concentrações testadas do produto químico em estudo.

Procedimento de ensaio

- Número de execuções realizadas;
- Concentrações do produto químico em estudo, aplicação e tempo de exposição utilizado (se diferente do recomendado);
- Duração da exposição,
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;

- Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

- Quadro com os dados, incluindo o valor CV70 (se pertinente), IE, valores de viabilidade celular, valores CE150 (se pertinente) obtidos para o produto químico em estudo e para o controlo positivo em cada execução, bem como uma indicação da classificação do produto químico em estudo segundo o modelo preditivo;
- Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o método U-SENS™;
- Análise dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso se disponha de outras informações pertinentes.

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Disponível em: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Disponível em: [\[http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705\]](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705).
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Disponível em: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: [\[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm\]](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm).
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kollé, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Disponível em: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruxelas. Disponível em: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Apêndice 2.1

DEFINIÇÕES

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (14).

AOP (*Adverse Outcome Pathway* – via determinante dos efeitos nocivos): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (15).

Resposta de CD86 ligada à concentração: O efeito é dependente da concentração (ou resposta ligada à concentração) quando uma concentração positiva (IE CD86 \geq 150) é seguida de uma concentração com um IE CD86 ainda maior.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

CV70: Concentração estimada que apresenta uma viabilidade celular de 70 %.

Deriva: A deriva é definida pelo seguinte: i) valor corrigido %CD86⁺ do replicado 3 do controlo não tratado é inferior a 50 % da média corrigida do valor %CD86⁺ dos replicados 1 e 2 do controlo não tratado; e ii) valor corrigido %CD86⁺ do replicado 3 do controlo negativo é inferior a 50 % da média corrigida do valor %CD86⁺ dos replicados 1 e 2 do controlo negativo.

CE150: Concentrações estimadas que apresentam um IE de 150 % para a expressão de CD86.

Citometria de fluxo: Técnica citométrica na qual células em suspensão num fluido passam, uma a uma, por um foco de excitação luminosa, disperso em padrões característicos das células e dos seus componentes; as células são frequentemente marcadas com marcadores fluorescentes, para que a luz seja primeiro absorvida e depois emitida a uma frequência diferente.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment* – abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e

caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

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

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

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

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica, por exemplo por oxidação.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (14).

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios, utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (14).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo simultaneamente com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz

resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (14).

IE: Índice de estimulação. Valores relativos da média geométrica da intensidade de fluorescência das células tratadas com o produto químico em comparação com as células tratadas com o solvente.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/veículo interage com o sistema de ensaio.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (14).

Tampão de coloração: Uma solução salina de tampão fosfato com 5 % de soro fetal de vitelo.

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

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

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (16).

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

Ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido (14).

Apêndice 2.2**SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA**

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo corretamente a previsão esperada com o método U-SENS™ para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores CV70 e CE150 que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem o conjunto de respostas possíveis no que diz respeito aos perigos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o método U-SENS™. Além disso, estão disponíveis dados de referência publicados para o método U-SENS™ (1) (8).

Quadro 1: Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o método U-SENS™

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão <i>in vivo</i> ¹	U-SENS™ Solvente/ Veículo	U-SENS™ Intervalo de referência CV70 em µg/ml ²	U-SENS™ Intervalo de referência CE150 em µg/ml ²
4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	Sensibilizante (forte)	Meio completo ³	< 30	Positivo (≤ 10)
Ácido picrilsulfônico	2508-19-2	Líquido	Sensibilizante (forte)	Meio completo	> 50	Positivo (≤ 50)
Maleato de dietilo	141-05-9	Líquido	Sensibilizante (moderado)	DMSO	10-100	Positivo (≤ 20)
Resorcinol	108-46-3	Sólido	Sensibilizante (moderado)	Meio completo	> 100	Positivo (≤ 50)
Álcool cinâmico	104-54-1	Sólido	Sensibilizante (fraco)	DMSO	> 100	Positivo (10-100)
4-Alilanol	140-67-0	Líquido	Sensibilizante (fraco)	DMSO	> 100	Positivo (< 200)
Sacarina	81-07-2	Sólido	Não sensibilizante	DMSO	> 200	Negativo (> 200)
Glicerol	56-81-5	Líquido	Não sensibilizante	Meio completo	> 200	Negativo (> 200)
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	Não sensibilizante	Meio completo	> 200	Negativo (> 200)

Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	Não sensibilizante	DMSO	> 200	Negativo (> 200)
------------------	---------	--------	--------------------	------	-------	------------------

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

¹ A previsão de perigo (e potência) *in vivo* baseia-se em dados LLNA (1) (8). A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (17).

² Com base em valores históricos observados (1) (8).

³ Meio completo: meio RPMI-1640 complementado com 10 % de soro fetal de vitelo, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (8).

Apêndice 3

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: ENSAIO IL-8 LUC

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. Ao contrário dos ensaios que visam analisar o nível de expressão de marcadores de superfície celular, o ensaio IL-8 Luc permite quantificar as variações da expressão da IL-8, uma citocina associada à ativação das células dendríticas. Na linha celular repórter IL-8 derivada da linha celular THP-1 (THP-G8, estabelecida a partir da linha celular da leucemia monocítica aguda humana THP-1), a expressão da IL-8 é medida após exposição a sensibilizantes (1). O nível de expressão da luciferase é, depois, utilizado para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.
2. O ensaio IL-8 Luc foi objeto de um estudo de validação (2) realizado pelo Centro Japonês para a Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM), pelo **Ministério da Economia, do Comércio e da Indústria** (METI) e pela Sociedade Japonesa **para Alternativas à Experimentação em Animais (JSAAE)**, seguido de uma análise independente pelos pares (3) sob os auspícios do JaCVAM e do Ministério da Saúde, do Trabalho e da Segurança Social (MHLW), com o apoio da **Cooperação Internacional em matéria de Métodos de Ensaio** Alternativos (ICATM — International Cooperation on Alternative Test Methods). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o ensaio IL-8 Luc é considerado útil no âmbito de uma IATA para distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes, para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. As referências bibliográficas contêm exemplos da utilização de dados do ensaio IL-8 Luc combinados com outras informações (4) (5) (6).
3. O ensaio IL-8 Luc demonstrou ser transferível para laboratórios experientes em cultura celular e na medição da luciferase. O nível de reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial foi de 87,7 % e 87,5 %, respetivamente. Os dados obtidos com o estudo de validação (2) e outros estudos publicados (1) (6) demonstram que, em comparação com o método LLNA, o ensaio IL-8 Luc permitiu efetuar uma previsão positiva ou negativa para 118 de 143 produtos químicos, produziu resultados inconclusivos para 25 produtos químicos e apresenta uma precisão de 86 % (101/118), uma sensibilidade de 96 % (92/96) e uma especificidade de 41 % (9/22) para a distinção entre os produtos químicos sensibilizantes cutâneos (categoria 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes (sem categoria, de acordo com o GHS da ONU/CLP). Excluindo as substâncias que não são abrangidas pelo âmbito de aplicação descrito *infra* (ponto 5), o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 113 de 136 produtos químicos como positivos ou negativos e 23 produtos

químicos como inconclusivos. A precisão do ensaio IL-8 Luc é de 89 % (101/113), com uma sensibilidade de 96 % (92/96) e uma especificidade de 53 % (9/17). Utilizando os dados humanos citados em Urbisch *et al.* (7), o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 76 de 90 produtos químicos como positivos ou negativos e 14 produtos químicos como inconclusivos, com uma precisão de 80 % (61/76), uma sensibilidade de 93 % (54/58) e uma especificidade de 39 % (7/18). Excluindo as substâncias que não são abrangidas pelo seu âmbito de aplicação, o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 71 de 84 produtos químicos como positivos ou negativos e 13 produtos químicos como inconclusivos, com uma precisão de 86 % (61/71), uma sensibilidade de 93 % (54/58) e uma especificidade de 54 % (7/13). É mais provável que ocorram falsos negativos nas previsões efetuadas com o ensaio IL-8 Luc com produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo/moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que com produtos químicos com um potencial elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (6). No seu conjunto, estas informações corroboram o papel do ensaio do IL-8 Luc na identificação dos perigos de sensibilização cutânea. Os valores relativos à precisão do método de ensaio IL-8 Luc utilizado isoladamente servem apenas de orientação, uma vez que este método deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a situação no ser humano.

4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o ensaio IL-8 Luc é aplicável a produtos químicos em estudo que abrangem uma grande diversidade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potências de sensibilização cutânea (determinadas em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (2) (6).
5. Embora utilize o solvente X-VIVO™ 15, o ensaio IL-8 Luc permite avaliar corretamente os produtos químicos com $\log P > 3,5$ e os produtos químicos com uma solubilidade na água de cerca de 100 µg/ml, tal como calculado com o programa EPI Suite™. Além disso, o seu desempenho para detetar sensibilizantes com fraca solubilidade na água é superior ao do ensaio IL-8 Luc utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente (2). No entanto, os resultados negativos obtidos com produtos químicos em estudo não dissolvidos a 20 mg/ml podem ser falsos negativos, devido à sua incapacidade para se dissolverem no X-VIVO™ 15. Por conseguinte, para estes produtos químicos, os resultados negativos não devem ser tidos em conta. No estudo de validação, observou-se uma elevada taxa de falsos negativos para os anidridos. Além disso, devido à capacidade metabólica limitada da linha celular utilizada (8) e às condições experimentais, os pró-haptenos (substâncias que requerem

ativação metabólica) e os pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação) podem produzir resultados negativos no ensaio. No entanto, embora os resultados negativos obtidos com potenciais pré-haptenos ou pró-haptenos devam ser interpretados com prudência, o método IL-8 Luc permitiu identificar corretamente 11 de 11 pré-haptenos, 6/6 pró-haptenos e 6/8, pré-/pró-haptenos, no conjunto de dados do ensaio IL-8 Luc (2). O exame completo recentemente efetuado de três métodos de ensaio sem experimentação animal (o DPRA, o KeratinoSens™ e o h-CLAT) para detetar pré-haptenos e pró-haptenos (9) e o facto de as células THP-G8 utilizadas no ensaio IL-8 Luc serem uma linha celular derivada da THP-1, utilizada no método h-CLAT, permitem concluir que o ensaio IL-8 Luc, combinado com outros métodos, pode contribuir igualmente para melhorar a sensibilidade dos métodos sem recurso a animais na deteção de pré-haptenos e pró-haptenos. Os tensioativos testados até à data deram resultados positivos falsos, independentemente da sua tipologia (catiônicos, aniônicos ou não iónicos). Por último, os produtos químicos que interferem com a luciferase podem alterar a sua atividade/medição, provocando uma inibição aparente ou um aumento da luminescência (10). Por exemplo, foi notificado que concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 µM interferem com sinais de luminescência noutros ensaios por gene repórter da luciferase, devido à sobreativação do gene repórter da luciferase. Por conseguinte, a expressão da luciferase obtida na presença de concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de compostos suspeitos de ativar o gene repórter da luciferase de modo similar deve ser examinada com prudência (11). Atendendo ao que precede, os tensioativos, os anidridos e os produtos químicos que interferem com a luciferase são excluídos do âmbito de aplicação do presente ensaio. Nos casos em que seja demonstrado que o ensaio IL-8 Luc não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, este ensaio não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

6. Tal como descrito acima, o ensaio IL-8 Luc ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. É necessário prosseguir os trabalhos, de preferência com base em dados humanos, para determinar se os resultados do IL-8 Luc poderão contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização cutânea quando considerados em combinação com outras fontes de informação.
7. São apresentadas definições no apêndice 3.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

8. O método de ensaio IL-8 Luc utiliza uma linha celular da leucemia monocítica humana, THP-1, obtida junto da American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). A partir desta linha celular, o Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Tohoku desenvolveu a linha celular repórter IL-8, derivada da THP-1, a

THP-G8, que contém os genes da luciferase laranja (Stable Luciferase Orange, SLO) e vermelha (Stable Luciferase Red, SLR), sob o controlo dos promotores da IL-8 e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), respetivamente (1). Este sistema permite quantificar a indução do gene da luciferase por deteção da luminescência produzida por substratos de luciferase conhecidos pela sua emissão luminosa como indicador da atividade da IL-8 e da GAPDH nas células após a exposição a produtos químicos sensibilizantes.

9. O sistema de ensaio bicolor inclui uma luciferase emissora de laranja (SLO; $\lambda_{\text{máx.}} = 580 \text{ nm}$) (12) para a expressão genética do promotor da IL-8, bem como uma luciferase emissora de vermelho (SLR; $\lambda_{\text{máx.}} = 630 \text{ nm}$) (13) para a expressão genética do promotor do controlo interno, GAPDH. As duas luciferases emitem cores diferentes quando reagem à d-luciferina de pirilampo e a sua luminescência é medida simultaneamente aquando de uma reação numa só etapa, dividindo a emissão proveniente da mistura do ensaio com o auxílio de um filtro ótico (14) (apêndice 3.2).
10. As células THP-G8 são tratadas durante 16 horas com o produto químico em estudo, após o que a atividade da luciferase SLO (SLO-LA), indicativa da atividade do promotor da IL-8, e da luciferase SLR (SLR-LA), indicativa da atividade do promotor da GAPDH, são medidas. Para facilitar a compreensão das abreviaturas, SLO-LA e SLR-LA são designadas, respetivamente, por IL8LA e GAPLA. O quadro 1 apresenta uma descrição dos termos associados à atividade da luciferase no ensaio IL-8 Luc. Os valores medidos são utilizados para calcular a IL8LA normalizado (nIL8LA), ou seja, o rácio IL8LA/GAPLA; a indução da nIL8LA (Ind-IL8LA), que é o rácio entre a média aritmética dos quatro valores medidos da nIL8LA das células THP-G8 tratadas com o produto químico em estudo e os valores da nIL8LA das células THP-G8 não tratadas; e a inibição da GAPLA (Inh-GAPLA), que é o rácio entre a média aritmética dos quatro valores medidos da GAPLA das células THP-G8 tratadas com um produto químico em estudo e os valores da GAPLA das células THP-G8 não tratadas, e é utilizada como indicador de citotoxicidade.

Quadro 1: Descrição dos termos associados à atividade da luciferase no ensaio IL-8 Luc

Abreviaturas	Definição
GAPLA	Atividade da luciferase SLR indicativa da atividade do promotor da GAPDH
IL8LA	Atividade da luciferase SLO indicativa da atividade do promotor da IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos/nIL8LA das células não tratadas

Inh-GAPLA	GAPLA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos/GAPLA das células não tratadas
CV05	A concentração mais baixa do produto químico à qual a Inh-GAPLA passa a ser $< 0,05$.

11. Estão disponíveis normas de desempenho (15) que permitem facilitar a validação de métodos de ensaio *in vitro* modificados utilizando ensaios IL-8 da luciferase semelhantes ao ensaio IL-8 Luc, bem como modificar rapidamente as orientações de ensaio 442E da OCDE para que passem a incluir os referidos métodos. A aceitação mútua de dados (AMD) da OCDE só será garantida para métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho, se esses métodos tiverem sido examinados e incluídos nas orientações de ensaio 442E pela OCDE (16).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

12. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 3.3, em conformidade com as boas práticas para os métodos *in vitro* (17). Além disso, os utilizadores do ensaio devem conservar uma base de dados históricos resultantes dos controlos de reatividade (ver ponto 15), obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 21 a 24), e utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório se mantém ao longo do tempo.

PROCEDIMENTO

13. O procedimento operacional normalizado (PON) para o ensaio IL-8 Luc está disponível e deve ser utilizado para a realização do ensaio (18). Os laboratórios que desejem aplicar este ensaio podem obter a linha celular recombinante THP-G8 junto do laboratório GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão, após a assinatura de um acordo de transferência de material, em conformidade com as condições enunciadas no modelo de acordo da OCDE. Os pontos que se seguem apresentam uma descrição dos principais elementos e procedimentos do ensaio.

Preparação das células

14. Convém utilizar a linha celular THP-G8 do laboratório GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão, para realizar o ensaio IL-8 Luc (ver pontos 8 e 13). Após a receção, as células são propagadas (2-4 passagens) e armazenadas congeladas, como uma reserva homogénea. As

células desta reserva podem ser propagadas até um máximo de 12 passagens ou um máximo de seis semanas. O meio utilizado para a propagação é o meio de cultura RPMI-1640 com 10 % de soro bovino fetal (SBF), uma solução antibiótica/antimicótica (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B numa solução salina a 0,85 %) (por exemplo, GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml de puromicina (por exemplo, n.º CAS 58-58-2) e 300 µg/ml de G418 (por exemplo, n.º CAS 108321-42-2).

15. Antes da utilização para o ensaio, as células devem ser qualificadas através de um controlo de reatividade. Esta verificação deve ser efetuada uma a duas semanas ou duas a quatro passagens após descongelação, utilizando como controlo positivo o brometo de 4-nitrobenzilo (4-NBB) (n.º CAS: 100-11-8, pureza ≥ 99 %) e como controlo negativo o ácido láctico (AL) (n.º CAS: 50-21-5, pureza ≥ 85 %). O 4-NBB deve produzir uma resposta positiva para Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), ao passo que o ácido láctico deve produzir uma resposta negativa para Ind-IL8LA ($< 1,4$). Apenas são utilizadas para o ensaio células que tenham passado o controlo de reatividade. O controlo de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 22 a 24.
16. Para o ensaio, as células THP-G8 são inoculadas a uma densidade de 2 a 5×10^5 células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante 48 a 96 horas. No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são lavadas com RPMI-1640 contendo 10 % de SBF sem antibióticos e, em seguida, colocadas novamente em suspensão com RPMI-1640 contendo 10 % de SBF sem antibióticos a 1×10^6 células/ml. Em seguida, as células são distribuídas por uma placa negra de 96 poços de fundo plano (por exemplo, Costar Cat#3603) com 50 µl (5×10^4 de células/poço).

Preparação do produto químico em estudo e das substâncias de controlo

17. O produto químico em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. Para o ensaio IL-8 Luc, os produtos químicos em estudo são dissolvidos em X-VIVO™ 15, um meio isento de soro comercialmente disponível (Lonza, 04-418Q), até atingir uma concentração final de 20 mg/ml. O meio X-VIVO™ 15 é adicionado, num tubo de microcentrifuga, a 20 mg de produto químico em estudo (independentemente da solubilidade deste), até atingir um volume de 1 ml e, em seguida, é misturado vigorosamente num vórtex e agitado num rotor a uma velocidade máxima de 8 rpm durante 30 minutos a uma temperatura ambiente de cerca de 20 °C. Além disso, se os produtos químicos sólidos continuarem por dissolver, o tubo é sonicado até à dissolução completa do produto químico ou até à obtenção de uma dispersão estável. No caso de produtos químicos solúveis em X-VIVO™ 15, a solução é diluída por um fator de 5 no X-VIVO™

15 e utilizada como solução-mãe do produto químico em estudo no X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). No caso de produtos químicos não solúveis em X-VIVO™ 15, a mistura é novamente misturada por rotação durante pelo menos 30 minutos, e depois centrifugada a 15 000 rpm ($\approx 20\ 000g$) durante 5 minutos; o sobrenadante é utilizado como solução-mãe do produto químico em estudo no X-VIVO™ 15. Caso sejam utilizados outros solventes, como DMSO, água ou o meio de cultura, a escolha deve ser fundamentada cientificamente. O procedimento pormenorizado para a dissolução dos produtos químicos é descrito no apêndice 3.5. As soluções X-VIVO™ 15 descritas nos pontos 18 a 23 são misturadas na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões de células preparadas numa placa negra de 96 poços de fundo plano (ver ponto 16).

18. A primeira execução do ensaio destina-se a determinar a concentração citotóxica e a examinar o potencial de sensibilização cutânea dos produtos químicos. Utilizando o X-VIVO™ 15, são efetuadas diluições em série, de fator 2, das soluções-mãe dos produtos químicos em estudo no X-VIVO™ 15 (ver apêndice 3.5) utilizando um bloco de ensaio de 96 poços (por exemplo, Costar Cat#EW-01729-03). Em seguida, acrescentam-se 50 μ l/poço de solução diluída a 50 μ l das células em suspensão numa placa negra de 96 poços de fundo plano. Assim, no caso de produtos químicos solúveis em X-VIVO™ 15, as concentrações finais dos produtos químicos em estudo variam entre 0,002 e 2 mg/ml (apêndice 3.5). No caso dos produtos químicos em estudo que não são solúveis em X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml, apenas são determinados fatores de diluição entre 2 e 2^{10} , apesar de as concentrações finais reais dos produtos químicos em estudo se manterem incertas e dependerem da concentração saturada dos produtos químicos em estudo na solução-mãe X-VIVO™ 15.
19. Nas execuções seguintes (isto é, o segundo, o terceiro e o quarto replicados), a solução-mãe X-VIVO™ 15 é preparada a uma concentração quatro vezes superior à concentração de viabilidade celular 05 (CV05; a concentração mais baixa à qual a Inh-GAPLA passa a ser $< 0,05$) observada na primeira experiência. Se a Inh-GAPLA não descer abaixo dos 0,05 à concentração mais elevada na primeira execução, a solução-mãe X-VIVO™ 15 é preparada à concentração mais elevada da primeira execução. A concentração CV05 é calculada dividindo a concentração da solução-mãe da primeira execução pelo fator de diluição de CV05 (X) (fator de diluição CV05 (X); o fator de diluição necessário para diluir a solução-mãe até alcançar o valor CV05) (ver apêndice 3.5). Para as substâncias em estudo não solúveis em X-VIVO a 20 mg/ml, o valor CV05 é determinado pela concentração da solução-mãe $\times 1/X$. Para as execuções 2 a 4, prepara-se uma segunda solução-mãe a uma concentração de $4 \times CV50$ (apêndice 3.5).

20. Efetuam-se diluições em série das segundas soluções-mãe do X-VIVO™ 15 por um fator de 1,5 utilizando um bloco de ensaio de 96 poços. Em seguida, acrescentam-se 50 µl/poço de solução diluída a 50 µl da suspensão de células nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano. Cada concentração de cada produto químico em estudo deve ser testada em 4 poços. As amostras são, em seguida, misturadas num agitador de placas e incubadas durante 16 horas a 37 °C e 5 % CO₂, após o que a atividade da luciferase é determinada, como se descreve em seguida.
21. O controlo do solvente é a mistura de 50 µl/poço de X-VIVO™ 15 e de 50 µl/poço da suspensão de células no RPMI-1640 contendo 10 % de SBF.
22. O controlo positivo recomendado é o 4-NBB. A 20 mg de 4-NBB preparados num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, é acrescentado X-VIVO™ 15 até atingir 1 ml. O tubo é misturado num vórtex vigorosamente e agitado num rotor a uma velocidade máxima de 8 rpm durante, pelo menos, 30 minutos. Após centrifugação a 20 000 g durante 5 minutos, o sobrenadante é diluído por um fator de 4 no X-VIVO™ 15 e 500 µl do sobrenadante diluído são transferidos para um poço num bloco de ensaio de 96 poços. O sobrenadante diluído é novamente diluído em X-VIVO™ 15 por fatores de 2 e de 4 e, em seguida, são adicionados 50 µl da solução a 50 µl de suspensão de células THP-G8 nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano (apêndice 3.6). Cada concentração do controlo positivo deve ser testada em 4 poços. A placa é agitada num agitador de placas e incubada numa incubadora de CO₂ durante 16 horas (37 °C, 5 % CO₂), após o que a atividade da luciferase é medida, conforme descrito no ponto 29.
23. O controlo negativo recomendado é o ácido láctico. A 20 mg deste, preparado num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, acrescenta-se X-VIVO™ 15 até atingir 1 ml (20 mg/ml). Diluem-se 20 mg/ml de solução de ácido láctico por um fator de 5 no X-VIVO™ 15 (4 mg/ml) e transferem-se 500 µl desta solução de ácido láctico a 4 mg/ml para um poço de um bloco de ensaio de 96 poços. Esta solução é diluída por um fator de 2 em X-VIVO™ 15 e, em seguida, diluída novamente por um fator de 2, de modo a obter soluções a 2 mg/ml e 1 mg/ml. Acrescentam-se 50 µl destas três soluções e de controlo do veículo (X-VIVO™ 15) a 50 µl de células THP-G8 em suspensão nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano. Cada concentração do controlo negativo é testada em 4 poços. A placa é agitada num agitador de placas e incubada numa incubadora de CO₂ durante 16 horas (37 °C, 5 % CO₂), após o que a atividade da luciferase é medida, conforme descrito no ponto 29.
24. Podem utilizar-se outros controlos positivos ou negativos adequados, se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução.

25. Deve ter-se o cuidado de evitar a evaporação de produtos químicos em estudo voláteis e a contaminação cruzada entre poços pelos produtos químicos em estudo, por exemplo selando a placa antes da incubação com os produtos químicos em estudo.
26. Os produtos químicos em estudo e o controlo do solvente exigem 2 a 4 execuções para derivar uma previsão positiva ou negativa (ver quadro 2). Cada execução é efetuada num dia diferente, com uma solução-mãe dos produtos químicos em estudo no X-VIVO™ 15 fresca e células colhidas separadamente. As células podem ser provenientes da mesma passagem.

Medições da atividade da luciferase

27. A luminescência é medida utilizando um luminómetro para microplacas de 96 poços equipado com filtros óticos, por exemplo das séries Phelios (ATTO, Tóquio, Japão), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Alemanha) ou ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Para garantir a reprodutibilidade, o luminómetro deve ser calibrado para cada ensaio (19). Estão disponíveis para esta calibração luciferases recombinantes de cor de laranja e vermelha.
28. Transfere-se 100 µl de reagente pré-aquecido Tripluc® Luciferase (Tripluc) para cada poço da placa que contém a suspensão de células tratadas, com ou sem produto químico. A placa é agitada durante 10 minutos a uma temperatura ambiente de cerca de 20 °C antes de ser colocada no luminómetro para medir a atividade da luciferase. A bioluminescência é medida durante três segundos sem filtro ótico (F0) e, em seguida, durante três segundos com filtro ótico (F1). Deve justificar-se o recurso a parâmetros alternativos, por exemplo em função do modelo de luminómetro utilizado.
29. Para cada concentração, os parâmetros são calculados a partir dos valores medidos, por exemplo IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, a média ± desvio padrão (DP) da IL8LA, a média ± DP da GAPLA, a média ± DP da nIL8LA, a média ± DP da Ind-IL8LA, a média ± DP da Inh-GAPLA e o intervalo de confiança de 95 % da Ind-IL8LA. As definições dos parâmetros utilizados no presente ponto são fornecidas nos apêndices I e IV, respetivamente.
30. Antes de proceder à medição num ensaio de repórter multicolor, convém realizar uma discriminação das cores, geralmente com o auxílio de detetores (luminómetro e leitor de placas) equipados com filtros óticos, tais como filtros de rejeição de banda (passa-alta ou passa-baixa) ou filtros passa-banda. Os coeficientes de transmissão dos filtros para cada cor do sinal de bioluminescência devem ser calibrados antes do ensaio, em conformidade com o apêndice 3.2.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

31. Os critérios a respeitar em cada execução para obter uma decisão positiva/negativa são os seguintes:

- uma previsão com o ensaio IL-8 Luc é considerada positiva se o produto químico em estudo apresentar um valor Ind-IL8LA $\geq 1,4$ e se o limite inferior do intervalo de confiança de 95 % para Ind-IL8LA for $\geq 1,0$;
- uma previsão com o ensaio IL-8 Luc é considerada negativa se o produto químico em estudo apresentar um valor Ind-IL8LA $< 1,4$ e/ou se o limite inferior do intervalo de confiança de 95 % para Ind-IL8LA for $< 1,0$.

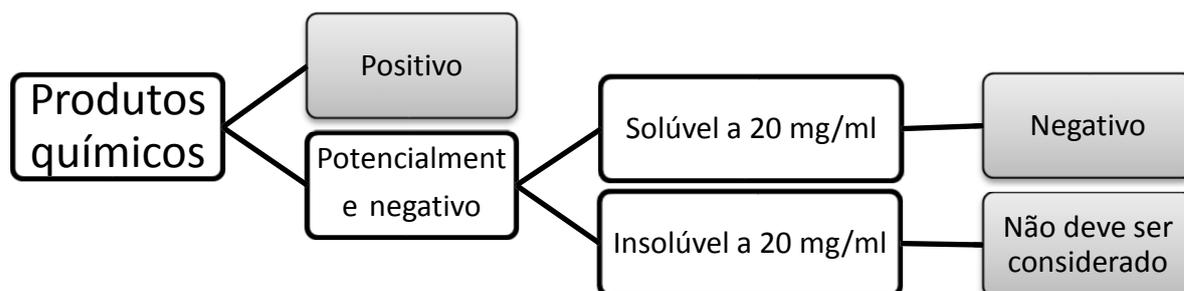
Modelo preditivo

32. Os produtos químicos em estudo que apresentam dois resultados positivos entre a primeira, a segunda, a terceira ou a quarta execuções são considerados positivos, ao passo que os que apresentam três resultados negativos entre a primeira, a segunda, a terceira ou a quarta execuções são considerados potencialmente negativos (quadro 2). Entre os produtos químicos potencialmente negativos, os produtos químicos dissolvidos a 20 mg/ml no X-VIVO™ 15 são considerados negativos, ao passo que os produtos químicos não dissolvidos a 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 não devem ser tidos em conta (figura 1).

Quadro 2: Critérios de identificação dos produtos positivos e potencialmente negativos

1. ^a execução	2. ^a execução	3. ^a execução	4. ^a execução	Previsão final
Positivo	Positivo	-	-	Positivo
	Negativo	Positivo	-	Positivo
Negativo		Negativo	Positivo	Positivo
			Negativo	Potencialmente negativo
	Positivo	Positivo	-	Positivo
		Negativo	Positivo	Positivo
			Negativo	Potencialmente negativo
		Negativo	Positivo	Positivo
			Negativo	Potencialmente negativo
		Negativo	-	Potencialmente negativo

Figura 1: Modelo preditivo para a decisão final



Critérios de aceitação

33. Ao utilizar o método de ensaio IL-8 Luc, devem respeitar-se os critérios de aceitação a seguir indicados:

- O valor Ind-IL8LA deve ser superior a 5,0, pelo menos, a uma concentração do controlo positivo, 4-NBB, em cada execução.
- O valor Ind-IL8LA deve ser inferior a 1,4 a qualquer concentração do controlo negativo (ácido láctico), em cada execução.
- Os dados resultantes de placas para as quais o valor GAPLA dos poços de controlo com células e Tripluc mas sem produtos químicos seja inferior a 5 vezes o valor dos poços que contêm apenas o meio de ensaio (50 µl/poço de RPMI-1640 contendo 10 % de SBF e 50 µl/poço de X-VIVO™ 15) não devem ser tidos em conta.
- Os dados resultantes de placas para as quais o valor Inh-GAPLA a todas as concentrações dos produtos químicos em estudo ou de controlo seja inferior a 0,05 não devem ser tidos em conta. Neste caso, a primeira execução deve ser repetida, de modo a que a concentração final mais elevada no ensaio replicado seja a concentração final mais baixa da execução anterior.

Relatório de ensaio

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

Produtos químicos em estudo

Substância monocomponente:

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, solubilidade na água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas pertinentes, na medida em que estejam disponíveis;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Solubilidade em X-VIVO™ 15. No caso de produtos químicos insolúveis em X-VIVO™ 15, se se observa precipitação ou flotação após centrifugação;
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo, se não tiver sido utilizado o X-VIVO™ 15.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (*ver supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (*ver supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;
- Aspeto físico, solubilidade na água e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;
- Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Solubilidade em X-VIVO™ 15. No caso de produtos químicos insolúveis em X-VIVO™ 15, se se observa precipitação ou flotação após centrifugação;
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.
- Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo, se não tiver sido utilizado o X-VIVO™ 15.

Controlos

Controlo positivo:

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Aspeto físico, solubilidade na água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas, se conhecidas e se pertinente;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Concentração(ões) testada(s);
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Referência a resultados históricos relativos ao controlo positivo que demonstrem a conformidade com os critérios de aceitação, se pertinente.

Controlo negativo:

- Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS e/ou outros identificadores;
- Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
- Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se forem utilizados controlos negativos diferentes dos mencionados nas orientações de ensaio e na medida em que se encontrem disponíveis;
- Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
- Justificação da escolha do solvente, para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

- Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;
- Descrição do método de ensaio utilizado;
- Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);
- Número de lote e origem do SBF, nome do fornecedor, número de lote da placa negra de 96 poços de fundo plano e número de lote do reagente Tripluc;
- Número de passagens e densidade celular utilizadas para o ensaio;

- Método de contagem celular utilizado para a inoculação antes do ensaio e medidas tomadas para assegurar a homogeneidade da distribuição do número de células;
- Luminómetro utilizado (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, substrato de luciferase utilizado e demonstração da adequação das medições de luminescência com base no ensaio de controlo descrito no apêndice 3.2;
- Procedimento utilizado para demonstrar a competência do laboratório para a realização do ensaio (por exemplo, através testando as substâncias para a demonstração de competência) ou para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo.

Procedimento de ensaio

- Número de replicados e de execuções efetuadas;
- Concentrações do produto químico em estudo, procedimento de aplicação e tempo de exposição (se forem diferentes dos recomendados);
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;
- Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

- Medições de IL8LA e GAPLA;
- Cálculos para nIL8LA, Ind-IL8LA e Inh-GAPLA;
- O intervalo de confiança de 95 % de Ind-IL8LA;
- Gráfico ilustrativo das curvas dose-resposta para a indução da atividade da luciferase e a viabilidade;
- Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o ensaio IL-8 Luc;
- Exame dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso estejam disponíveis outras informações pertinentes.

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.

- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 38:275-84.
- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891-4.
- (15) OECD (2017). A publicar - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, França
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, França.

- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol. Disponível em: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, França.
- (21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Apêndice 3.1

DEFINIÇÕES

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (16).

AOP (*Adverse Outcome Pathway* – via determinante dos efeitos nocivos): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (20).

Produto químico: Uma substância ou mistura.

CV05: Viabilidade celular 05, ou seja, a concentração mínima à qual os produtos químicos produzem um valor Inh-GAPLA inferior a 0,05.

FinSLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a Ind-IL8LA. Ver Ind-IL8LA para a definição.

GAPLA: Atividade da luciferase vermelha Stable Luciferase Red (SLR) ($\lambda_{\text{máx.}} = 630 \text{ nm}$), regulada pelo promotor da GAPDH e que demonstra a viabilidade celular e o número de células viáveis.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment* – abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

II-SLR-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a Inh-GAPLA. Ver Inh-GAPLA para a definição.

IL-8 (interleucina-8): Uma citocina derivada de células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e monócitos que provoca a quimiotaxia dos neutrófilos e dos

linfócitos T.

IL8LA: Atividade da luciferase laranja Stable Luciferase Orange (SLRO) ($\lambda_{\text{máx.}} = 580 \text{ nm}$), regulada pelo promotor da IL-8.

Ind-IL8LA: Variação de indução da IL8LA. Obtém-se dividindo o valor nIL8LA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos pelo valor das células THP-G8 não estimuladas; representa a indução da atividade do promotor da IL-8 por produtos químicos.

Inh-GAPLA: Inibição da GAPLA. Obtém-se dividindo o valor GAPLA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos pelo valor GAPLA das células THP-G8 não tratadas; representa a citotoxicidade dos produtos químicos.

Limiar mínimo de indução (LMI): A concentração mais baixa à qual um produto químico satisfaz os critérios de positividade.

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

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

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

nIL8LA: A atividade da SLO que reflete a atividade do promotor da IL-8 (IL8LA) normalizada pela atividade da SLR que reflete a atividade do promotor da GAPDH (GAPLA). Representa a atividade do promotor da IL-8 depois de considerar a viabilidade celular ou o número de células.

nSLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a nIL8LA. Ver nIL8LA para a definição

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (16).

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios, utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (16).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo simultaneamente com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (16).

SLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a IL8LA. Ver IL8LA para a definição.

SLR-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a GAPLA. Ver GAPLA para a definição.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/veículo interage com o sistema de ensaio.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (16).

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

Tensioativo: Também designado agente de superfície, é uma substância, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial de um líquido, permitindo-lhe formar

espuma ou penetrar em sólidos; é igualmente designado por agente molhante. (TG437)

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

THP-G8: Uma linha celular repórter da IL-8 utilizada no ensaio IL-8 Luc. A linha celular humana semelhante a macrófagos THP-1 foi transfetada com os genes da luciferase SLO e SLR sob o controlo dos promotores da IL-8 e da GAPDH, respetivamente.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS*): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (21).

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

Método de ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido.

Apêndice 3.2

PRINCÍPIO DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE E DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE TRANSMISSÃO DE FILTRO ÓTICO PARA SLO E SLR

O sistema de ensaio multirrepórter – Tripluc – pode ser utilizado com luminômetro de microplacas equipado com um sistema de detecção multicolor com filtro ótico (por exemplo, Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). O filtro ótico utilizado na medição é um filtro passa-alta ou passa-baixa de 600-620 nm ou um filtro passa-banda de 600-700 nm.

Medição de duas cores de luciferase com um filtro ótico

O exemplo seguinte utiliza o Phelios AB-2350 (ATTO). Este luminômetro está equipado com um filtro passa-alta de 600 nm (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, filtro 1) para separar a luminescência SLO ($\lambda_{\text{máx.}} = 580 \text{ nm}$) da luminescência SLR ($\lambda_{\text{máx.}} = 630 \text{ nm}$).

Para determinar os coeficientes de transmissão do filtro passa-alta de 600 nm, convém, em primeiro lugar, utilizando enzimas luciferases SLO e SLR purificadas: i) medir a intensidade da bioluminescência de SLO e SLR na ausência de filtro (F0), ii) medir a intensidade da bioluminescência de SLO e SLR que atravessou o filtro 1 (passa-alta 600 nm) e iii) calcular os coeficientes de transmissão do filtro 1 (600 nm) para SLO e SLR abaixo indicados.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	κO_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Se a intensidade de SLO e SLR na amostra de ensaio for definida como O e R, respetivamente, i) a intensidade da luz sem filtro (todas as óticas) F0 e ii) a intensidade da luz transmitida através do filtro 1 (600 nm) F1 são descritas como se segue.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Estas equações podem ser reformuladas do seguinte modo:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Em seguida, utilizando os fatores de transmissão calculados (κO_{R60} e κR_{R60}) e os valores F0 e F1 medidos, é possível calcular os valores O e R do seguinte modo:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiais e métodos para determinação do fator de transmissão

(1) Reagentes

Enzimas luciferases purificadas:

Enzima SLO purificada liofilizada

Enzima SLR purificada liofilizada

(que, para os trabalhos de validação, foram obtidas junto do GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão com a linha celular THP-G8)

Reagente do ensaio:

Reagente Tripluc® Luciferase (por exemplo, de TOYOBO Cat#MRA-301)

Meio: para o ensaio da luciferase (30 ml, armazenada a 2-8 °C)

Reagente	Conc.	Conc. final no meio	Volume necessário
RPMI-1640	-	-	27 ml
SBF	-	10 %	3 ml

(2) Preparação da solução enzimática

Dissolver a enzima luciferase purificada liofilizada no tubo, adicionando 200 µl de 10 ~ 100 mM Tris/HCl ou HEPES/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) e complementado com 10 % (m/v) de glicerol; dividir a solução enzimática em alíquotas de 10 µl em tubos descartáveis de 1,5 ml e armazená-los num congelador a -80 °C. A solução enzimática congelada pode ser utilizada no prazo de seis meses. Para utilizar as soluções, adicionar 1 ml de meio do ensaio da luciferase (RPMI-1640 com 10 % de SBF) a cada tubo de solução enzimática (solução enzimática diluída) e mantê-los em gelo, a fim de evitar a desativação.

(3) Medição da bioluminescência

Descongelar o reagente do ensaio Tripluc® Luciferase e mantê-lo à temperatura ambiente, quer em banho-maria, quer à temperatura do ar. Ligar o luminómetro 30 minutos antes do início da medição para permitir a estabilização do

fotomultiplicador. Transferir 100 µl da solução enzimática diluída para uma placa negra de 96 poços (fundo plano) (amostra de referência SLO para #B1, #B2, #B3 e amostra de referência SLR para #D1, #D2, #D3). Em seguida, transferir 100 µl de Tripluc pré-aquecido para cada poço da placa que contém a solução enzimática diluída, utilizando uma pipeta automática. Agitar a placa durante 10 minutos à temperatura ambiente (cerca de 25 °C) num agitador de placas. Retirar as bolhas que se formarem nas soluções nos poços. Colocar a placa no luminómetro para medir a atividade da luciferase. A bioluminescência é medida durante três segundos sem filtro ótico (F0) e, em seguida, durante três segundos com filtro ótico (F1).

O coeficiente de transmissão do filtro ótico foi calculado do seguinte modo:

Coeficiente de transmissão (SLO (κ_{OR60}))= (#B1 de F1+ #B2 de F1+ #B3 de F1) / (#B1 de F0+ #B2 de F0+ #B3 de F0)

Coeficiente de transmissão (SLR (κ_{RR60}))= (#D1 de F1+ #D2 de F1+ #D3 de F1) / (#D1 de F0+ #D2 de F0+ #D3 de F0)

Os fatores de transmissão calculados são utilizados para todas as medições executadas utilizando o mesmo luminómetro.

Controlo da qualidade do equipamento

Devem utilizar-se os procedimentos descritos no protocolo IL-8 Luc (18).

Apêndice 3.3

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo a previsão esperada com o ensaio IL-8 Luc para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência (selecionadas para representar o intervalo de respostas possíveis ao perigo de sensibilização cutânea). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o ensaio IL-8 Luc. Além disso, existem dados de referência publicados para o ensaio IL-8 Luc (6) (1).

Quadro 1: Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o ensaio IL-8 Luc

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado	Solubilidade em X-VIVO15 a 20 mg/ml	Previsão <i>in vivo</i> ¹	Previsão IL-8 Luc ²	Intervalo de referência (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	MIT IL-8 Luc ⁵
2,4-Dinitroclorobenzeno	97-00-7	Sólido	Insolúvel	Sensibilizante (extremo)	Positivo	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldeído	50-00-0	Líquido	Solúvel	Sensibilizante (forte)	Positivo	9-30	4-9
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sólido	Insolúvel	Sensibilizante (moderado)	Positivo	250-290	60-250
Etilenodiamina	107-15-3	Líquido	Solúvel	Sensibilizante (moderado)	Positivo	500-700	0,1-0,4
Dimetacrilato de etilenoglicol	97-90-5	Líquido	Insolúvel	Sensibilizante (fraco)	Positivo	> 2000	0,04-0,1
4-Alilanisol (estragol)	140-67-0	Líquido	Insolúvel	Sensibilizante (fraco)	Positivo	> 2000	0,01-0,07
Sulfato de estreptomina	3810-74-0	Sólido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000
Glicerol	56-81-5	Líquido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000

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

¹ A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (19).

² Com base em valores históricos observados (1) (6).

³ Os valores CV05 e MIT IL-8 Luc foram calculados utilizando a solubilidade na água dada pelo programa EPI

SuiteTM.

⁴ CV05: a concentração mínima à qual os produtos químicos apresentam uma Inh-GAPLA inferior a 0,05.

⁵ MIT: as concentrações mais baixas às quais um produto químico satisfaz os critérios de positividade.

Apêndice 3.4

ÍNDICES E CRITÉRIOS DE APRECIACÃO

nIL8LA (nSLO-LA)

A j-ésima repetição ($j = 1$ a 4) da i-ésima concentração ($i = 0$ a 11) é medida para IL8LA (SLO-LA) e GAPLA (SLR-LA), respetivamente. A IL8LA normalizada, designada por nIL8LA (nSLO-LA), é definida como:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Trata-se da unidade de medida de base neste ensaio.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

O aumento médio do valor nIL8LA (nSLO-LA) para a repetição à i-ésima concentração em comparação com a mesma à concentração 0, Ind-IL8LA, é a medida principal deste ensaio. Esta relação é escrita através da fórmula seguinte:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

O laboratório principal propôs que um valor de 1,4 corresponda a um resultado positivo para o produto químico em estudo. Este valor baseia-se na investigação dos dados históricos do laboratório principal. A equipa de gestão dos dados utilizou, em seguida, este valor em todas as fases do estudo de validação. O principal resultado, Ind-IL8LA, é o rácio de duas médias aritméticas, tal como demonstrado na equação.

Intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %)

A precisão desta medida do resultado principal é estimada graças ao intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %) baseado no rácio. O limite inferior do IC 95 % ≥ 1 indica que o valor nIL8LA à i-ésima concentração é significativamente superior ao valor obtido com o controlo do solvente. O IC 95 % pode ser calculado de várias formas. No presente estudo, foi utilizado o método conhecido como teorema de Fieller. Segundo este teorema, o intervalo de confiança de 95 % obtém-se por recurso à seguinte fórmula:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

em que

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_i L8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_i L8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (n_i L8LA_{ij}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (n_i L8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$ é o percentil 97,5 da distribuição central t com o v do grau de liberdade, em que

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

O valor Inh-GAPLA é um rácio do valor GAPLA médio (SLR-LA) para a repetição da i-ésima concentração, comparativamente ao valor obtido com o controlo do solvente, escrito conforme se segue:

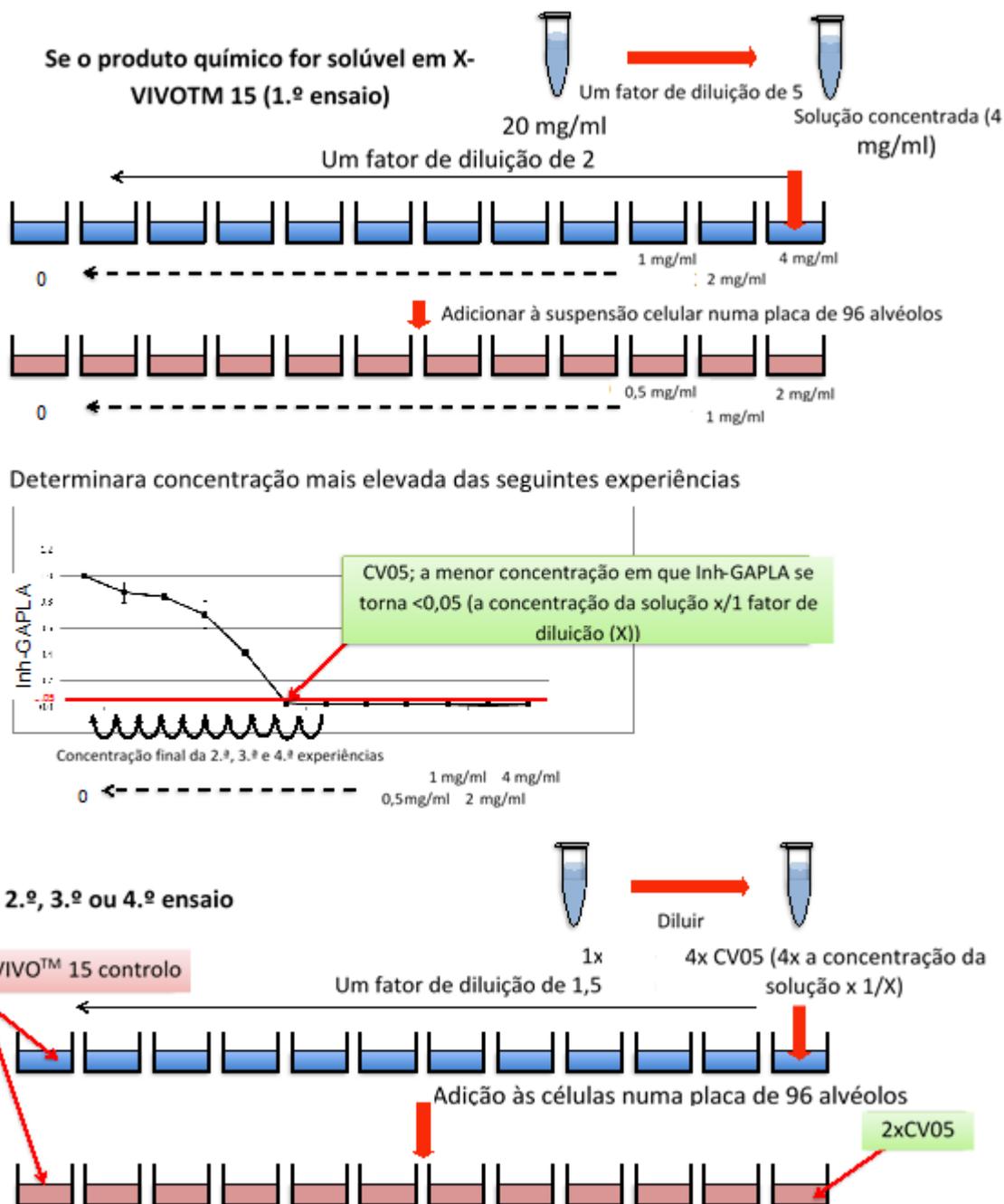
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Dado que o valor GAPLA é o denominador da niL8LA, um valor extremamente baixo provoca uma grande variação no valor niL8LA. Por conseguinte, os valores Ind-IL8LA com um valor extremamente baixo para Inh-GAPLA (inferior a 0,05), podem ser considerados pouco precisos.

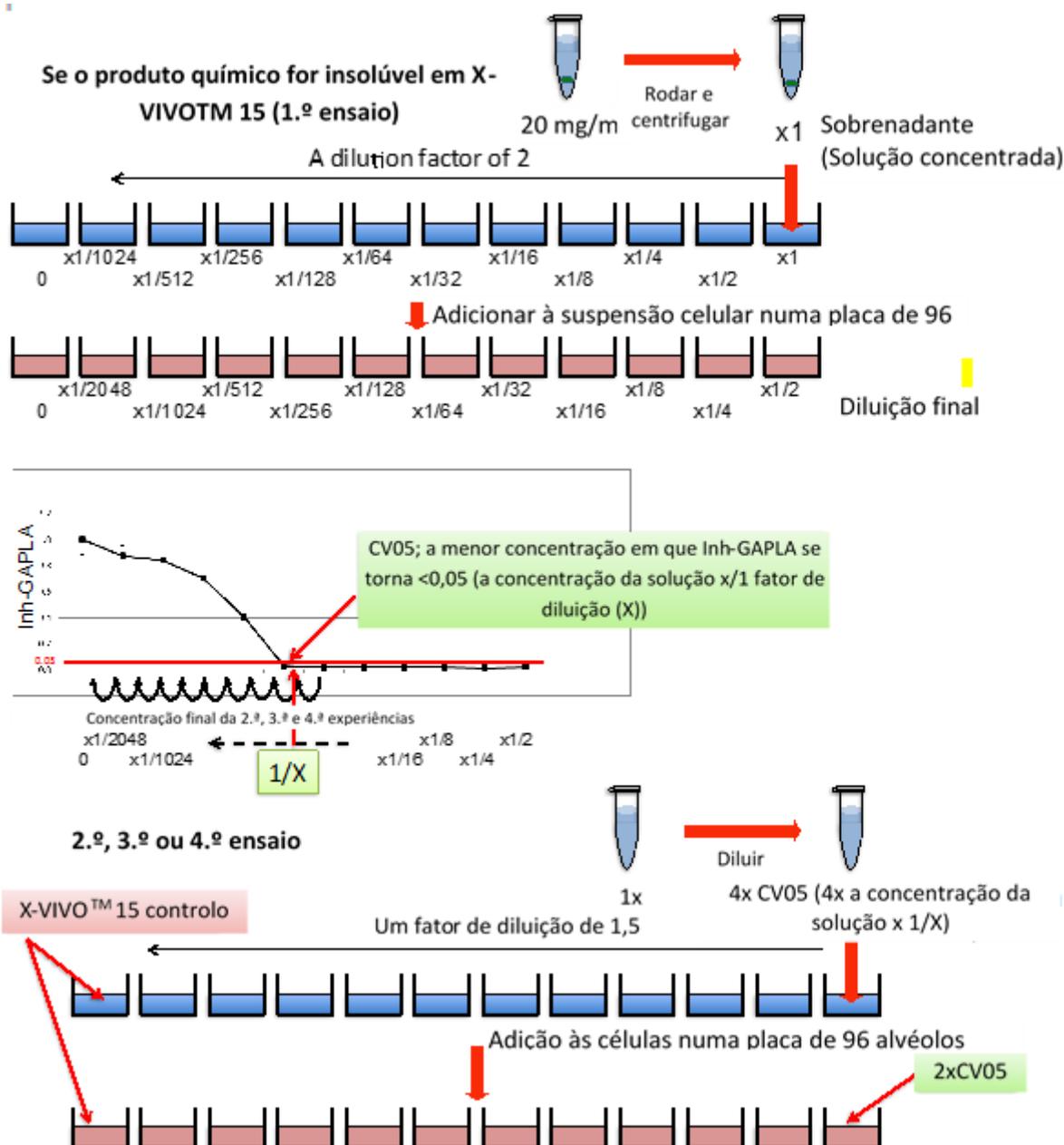
Apêndice 3.5

ESQUEMA DOS MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS PARA O ENSAIO IL-8 LUC.

(a) Para os produtos químicos dissolvidos em X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



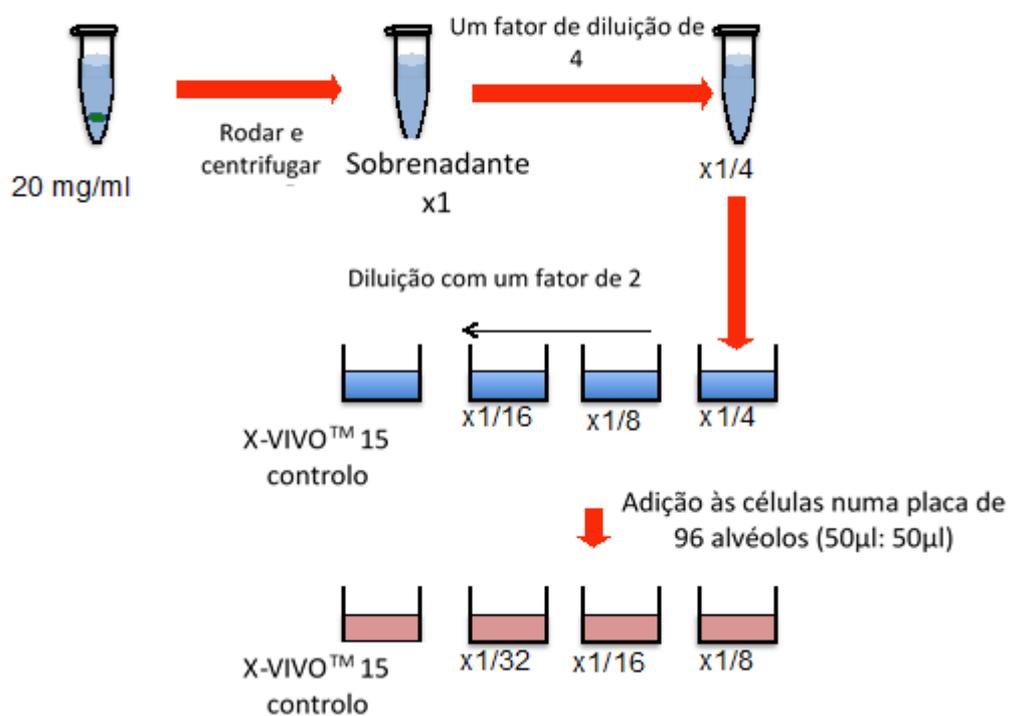
(b) Para produtos químicos insolúveis em X-VIVOTM 15 a 20 mg/ml



Apêndice 3.6

ESQUEMA DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE 4-NBB PARA O CONTROLO POSITIVO DO ENSAIO IL-8 LUC.

O controlo positivo: 4-NBB (insolúvel em X-VIVO™ 15)



»

(9) Na parte C, são aditados os seguintes capítulos:

«C.52 ENSAIO ALARGADO DE REPRODUÇÃO NUMA GERAÇÃO EM PEIXE-DO-ARROZ-JAPONÊS (MEOGRT)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente às orientações de ensaio 240 da OCDE (2015). Trata-se de um método de ensaio completo baseado na exposição de peixes ao longo de várias gerações, que visa obter dados passíveis de serem utilizados para avaliar os perigos e os riscos para o ambiente associados aos produtos químicos, nomeadamente produtos suspeitos de serem desreguladores endócrinos. A exposição no ensaio MEOGRT prolonga-se até à eclosão (até duas semanas pós-fecundação – «spf») na segunda geração (F2). Seriam necessárias investigações complementares para justificar a utilidade de um eventual prolongamento da geração F2 para além da eclosão; as informações atualmente disponíveis não fornecem condições nem critérios que justifiquem prolongar a geração F2. No entanto, o método pode ser atualizado à medida que forem surgindo novos dados e informações a ter em conta. Por exemplo, podem ser úteis, em determinadas circunstâncias, orientações para a extensão da geração F2 até à reprodução (por exemplo, no caso de produtos químicos com um elevado potencial de bioconcentração ou de indícios de efeitos transgeracionais noutras taxa). O método pode ser utilizado para avaliar potenciais efeitos crónicos dos produtos químicos – incluindo produtos químicos suscetíveis de terem efeitos desreguladores do sistema endócrino –, nos peixes. Enfatiza potenciais efeitos pertinentes ao nível da população (nomeadamente impactos negativos na sobrevivência, no desenvolvimento, no crescimento e na reprodução), a fim de calcular uma concentração sem efeitos observáveis (NOEC) ou uma concentração efetiva a x % (CE_x), embora se deva notar que as abordagens do tipo CE_x raramente são adequadas para estudos de grande dimensão deste tipo, em que o aumento do número de concentrações de ensaio a fim de determinar a CE_x desejada pode ser inviável e causar problemas significativos em termos de bem-estar animal devido ao elevado número de indivíduos utilizados. Para produtos químicos que não exijam uma avaliação ao longo de várias gerações ou que não sejam potenciais desreguladores endócrinos, pode ser mais adequado recorrer a outros métodos de ensaio (1). O peixe-do-arroz-japonês é a espécie adequada para utilização neste método de ensaio, dado o seu ciclo de vida curto e a possibilidade de determinar o sexo genético (2), que é considerado um componente crítico do método. Os procedimentos e os parâmetros específicos descritos são aplicáveis apenas ao peixe-do-arroz-japonês. Outras espécies de peixes de pequena dimensão (por exemplo, peixe-zebra) podem ser adaptadas a um protocolo de ensaio semelhante.

2. O presente método de ensaio mede vários parâmetros biológicos. Trata-se, em primeiro lugar, de enfatizar os potenciais efeitos nocivos nos parâmetros pertinentes em termos das populações, incluindo a sobrevivência, o desenvolvimento visível, o crescimento e a reprodução. Em segundo lugar, para fornecer informações mecanísticas e estabelecer ligações entre os resultados de outros tipos de estudos de campo e laboratoriais que proporcionem provas *a posteriori* de uma atividade potencialmente desreguladora do sistema endócrino (por exemplo, atividade androgénica ou estrogénica noutros testes e ensaios), obtêm-se outras informações úteis medindo o ARN mensageiro da *vitelogenina* (ARNm *vgt*) – ou a proteína vitelogenina, VTG –, determinando as características sexuais secundárias (CSS) fenotípicas relacionadas com o sexo genético e procedendo a uma avaliação histopatológica. Note-se que, se um produto químico em estudo ou os seus metabolitos não forem suspeitos de serem perturbadores endócrinos, pode não ser necessário medir estes parâmetros secundários e ser mais adequado realizar estudos que exijam uma quantidade inferior de recursos e de animais (1). As definições utilizadas no presente método de ensaio constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Devido ao número limitado de produtos químicos testados e de laboratórios envolvidos na validação do presente método de ensaio, bastante complexo, prevê-se que, quando estiver disponível um número suficiente de estudos para determinar o impacto desta nova conceção, o método seja reexaminado e, se necessário, atualizado à luz da experiência adquirida. Os dados podem ser utilizados ao nível 5 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos (3). O ensaio inicia-se com a exposição de peixes adultos (geração F0) ao produto químico em estudo durante a fase de reprodução. A exposição prossegue durante as fases de desenvolvimento e de reprodução na geração F1 e durante a fase de eclosão na geração F2; deste modo, o ensaio permite avaliar as vias endócrinas, tanto estruturais como ativacionais. Na interpretação dos parâmetros medidos a nível endócrino, pode aplicar-se uma abordagem baseada na análise do peso da prova.
4. O ensaio deve incluir um número de indivíduos suficiente para a avaliação dos parâmetros relativos à reprodução (ver apêndice 3), assegurando que esse número seja o mínimo necessário, por razões de bem-estar animal. Tendo em conta o elevado número de animais utilizados, é importante ponderar atentamente a necessidade de realizar o ensaio em função dos dados de que se disponha, os quais podem já conter informações pertinentes sobre muitos dos parâmetros medidos no ensaio MEOGRT. O documento da OCDE sobre o quadro de ensaio da toxicidade nos peixes pode auxiliar neste sentido (1).

5. O método de ensaio foi concebido essencialmente para distinguir os efeitos de uma única substância. No entanto, se for necessário realizar o ensaio de uma mistura, convém verificar se os resultados serão aceitáveis para a finalidade regulamentar pretendida.
6. Antes do início do ensaio, é importante dispor de informações sobre as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, nomeadamente para garantir a estabilidade das soluções químicas produzidas. É igualmente necessário dispor de um método analítico suficientemente sensível para verificar as concentrações do produto químico em estudo.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O ensaio começa pela exposição de machos e fêmeas sexualmente maduros (pelo menos 12 spf) em casais reprodutores, durante três semanas, no decurso as quais o produto químico em estudo é distribuído no organismo da geração parental (F0) de acordo com o respetivo comportamento toxicocinético. Os ovos são recolhidos o mais próximo possível do primeiro dia da quarta semana para iniciar a geração F1. Durante a criação da geração F1 (15 semanas no total), são avaliadas a taxa de eclosão e a sobrevivência. Além disso, os peixes são recolhidos às 9-10 spf para a medição dos parâmetros de desenvolvimento e a desova é avaliada durante três semanas, da spf 12 até à 14. A geração F2 é iniciada após a terceira semana de avaliação da reprodução e criada até ao final da eclosão.

CRITÉRIOS DE VALIDADE DO ENSAIO

8. São aplicáveis os seguintes critérios de validade do ensaio:
 - A concentração de oxigénio dissolvido deve ser $\geq 60\%$ do valor da saturação no ar durante todo o ensaio;
 - A temperatura média da água ao longo de todo o estudo deve situar-se entre 24 e 26 °C. Eventuais afastamentos de curta duração relativamente à média em determinados aquários não devem ser superiores a 2 °C;
 - A fecundidade média dos controlos em cada geração (F0 e F1) deve ser superior a 20 ovos por casal e por dia. A fertilidade de todos os ovos produzidos durante a avaliação deve ser superior a 80 %. Além disso, 16 dos 24 casais reprodutores de controlo recomendados (> 65 %) devem produzir mais de 20 ovos por casal e por dia;
 - A taxa de eclosão dos ovos deve ser $\geq 80\%$ (em média) nos controlos (em cada uma das gerações F1 e F2);

- A sobrevivência após a eclosão até 3 spf e a partir de 3 spf até à eutanásia, para a geração F1 (ou seja, 15 spf), deve ser $\geq 80\%$ (em média) e $\geq 90\%$ (em média), respetivamente, nos controlos (F1);
- Os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo dissolvido foram corretamente mantidas num intervalo de $\pm 20\%$ em relação à média dos valores medidos.

No que diz respeito à temperatura da água, embora não se trate de um critério de validade, os replicados no âmbito de um tratamento, assim como os grupos de tratamento no âmbito do ensaio, não devem diferir estatisticamente uns dos outros (atendendo às temperaturas medidas diariamente e excluindo eventuais afastamentos de curta duração).

9. Embora se possa observar uma diminuição da reprodução nos grupos expostos às concentrações mais elevadas, a reprodução deve ser suficiente, para encher as eclosoras, pelo menos no terceiro grupo mais exposto e em todos os grupos menos expostos da geração F0. Além disso, a sobrevivência embrionária no terceiro grupo mais exposto e nos grupos menos expostos da geração F1 deve permitir avaliar os parâmetros medidos aquando da amostragem subadulta (ver pontos 36 e 38 do apêndice 9). Além disso, deve-se observar pelo menos uma taxa mínima de sobrevivência pós-eclosão ($\sim 20\%$) no segundo grupo de exposição mais exposto de F1. Não se trata de critérios de validade *per se*, mas de recomendações destinadas a permitir o cálculo de NOEC sólidas.
10. Caso se observe um desvio em relação aos critérios de validade, devem analisar-se as consequências em relação à fiabilidade dos resultados do ensaio, devendo os desvios e a sua apreciação ser referidos no relatório de ensaio.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

11. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:

- a) Medidores de oxigénio e de pH;
- b) Equipamento para determinação da dureza e da alcalinidade da água;
- c) Aparelho adequado para o controlo da temperatura e, de preferência, um acompanhamento contínuo;
- d) Cubas de um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver apêndice 3);
- e) Balança de precisão apropriada (isto é, com uma precisão de $\pm 0,5$ mg).

Água

12. Pode utilizar-se nos ensaios qualquer água na qual a espécie em estudo apresente taxas adequadas de crescimento e de sobrevivência a longo prazo. A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente o resultado do ensaio (por exemplo, por complexação do produto químico em estudo) nem afeta negativamente o desempenho dos progenitores, devem colher-se regularmente amostras para análise. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , etc.), de pesticidas, de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão, por exemplo, de seis em seis meses, caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém relativamente constante. No apêndice 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a $\pm 0,5$ unidades de pH.

Sistema de exposição

13. Não se especificam a concepção e os materiais utilizados no sistema de exposição. Para a construção desse sistema, devem utilizar-se vidro, aço inoxidável ou outro material quimicamente inerte que não tenha sido contaminado em ensaios anteriores. Para efeitos do presente ensaio, pode ser adequado um sistema de exposição constituído por um sistema de fluxo contínuo (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Soluções de ensaio

14. A solução-mãe do produto químico em estudo deve ser introduzida no sistema de exposição por meio de uma bomba adequada. O débito da solução deve ser calibrado à luz da confirmação analítica das soluções de ensaio antes do início da exposição e deve ser objeto de controlo volumétrico periódico durante o ensaio. Em cada câmara, a solução é renovada em função das necessidades (por exemplo, mínimo de 5 renovações de volume/dia até 16 renovações de volume/dia ou até um débito de 20 ml/min), consoante a estabilidade do produto químico em estudo e a qualidade da água.
15. As soluções de ensaio são ajustadas à concentração pretendida por diluição da solução-mãe. De preferência, esta deve ser preparada por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição por meios mecânicos (agitação e/ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas/sistemas de saturação ou métodos de dosagem passiva (14) para obter uma solução-mãe com a concentração pretendida. Devem realizar-se todos os esforços para evitar a utilização de solventes ou outros veículos, porque: (1) alguns solventes podem, por si só, induzir toxicidade e/ou respostas indesejáveis ou inesperadas; (2) o ensaio de produtos químicos acima da sua

solubilidade em água (frequente quando se utilizam solventes) pode resultar em determinações inexatas das concentrações efetivas; (3) a utilização de solventes pode resultar num grau significativo de formação de biofilmes decorrente da atividade microbiana, passível de ter impacto nas condições ambientais, bem como na capacidade de manter concentrações de exposição e (4) na ausência de dados históricos que demonstrem que o solvente não influencia o resultado do estudo, a utilização de solventes exige um tratamento com base no bem-estar animal, na medida em que são necessários mais indivíduos para a realização do ensaio. Para os produtos químicos difíceis de ensaiar, é possível, em último recurso, utilizar um solvente; consultar o documento de orientações n.º 23 da OCDE sobre ensaios de toxicidade aquática de substâncias e misturas difíceis (15), para determinar o melhor método. A escolha do solvente será determinada pelas propriedades químicas do produto químico em estudo e pela existência de dados históricos sobre a utilização do solvente. Se forem utilizados solventes como veículos, devem realizar-se controlos adequados para o solvente para além dos controlos (negativos) sem solvente (apenas água de diluição). Caso seja inevitável a utilização de um solvente e ocorra atividade microbiana (formação de biofilmes), recomenda-se o registo ou a inclusão no relatório da presença de biofilme em cada cuba (pelo menos uma vez por semana) durante todo o ensaio. Idealmente, a concentração de solvente deve ser mantida constante no controlo com solvente e em todos os grupos de tratamento. Se tal não suceder, deve-se utilizar no controlo com solvente a concentração mais elevada utilizada no tratamento de ensaio. Nos casos em que se utiliza um solvente como veículo, as concentrações máximas de solvente não devem exceder 100 µl/l ou 100 mg/l (15), recomendando-se que se mantenha a concentração de solvente mais baixa possível (por exemplo, < 20 µl/l), para evitar os potenciais efeitos do solvente nos parâmetros medidos (16).

Animais de ensaio

Seleção e confinamento dos peixes

16. A espécie utilizada no ensaio é o peixe-do-arroz-japonês, *Oryzias latipes*, devido ao seu curto ciclo de vida e à possibilidade de determinar o sexo genético. Embora outras espécies de pequenos peixes possam ser adaptadas a um protocolo de ensaio semelhante, os métodos e parâmetros de observação específicos descritos no presente método de ensaio são aplicáveis apenas ao peixe-do-arroz-japonês (ver ponto 1). Esta espécie adapta-se bem à reprodução em cativeiro; foram publicados métodos para a sua cultura (17) (18) (19) e estão disponíveis dados relativos à letalidade a curto prazo, às primeiras fases da vida e ao ciclo de vida completo (5) (6) (8) (9) (20). Todos os peixes são submetidos a um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão. Os peixes são alimentados com artémias vivas (*Artemia* spp.), náuplios que podem ser complementados, se necessário,

com alimentos floculados disponíveis no mercado. Estes alimentos devem ser analisados regularmente para garantir que não estão contaminados.

17. Desde que sejam seguidas as práticas de criação adequadas, não é necessário aplicar um protocolo de cultura específico. Por exemplo, o peixe-do-arroz-japonês pode ser criado em cubas de 2 litros com 240 larvas por cuba até às 4 spf, depois em cubas de 2 litros com 10 peixes por cuba até às 8 spf, altura em que os casais reprodutores são transferidos para cubas de 2 litros.

Aclimação e seleção dos peixes

18. Os peixes de ensaio devem ser selecionados a partir de uma única unidade populacional de laboratório que tenha sido aclimatada durante, pelo menos, duas semanas antes do ensaio em condições de qualidade da água e de iluminação semelhantes às utilizadas no mesmo (este período de aclimação não é um período de pré-exposição *in situ*). Recomenda-se que os peixes de ensaio sejam obtidos a partir de uma cultura interna, uma vez que o transporte de peixes adultos provoca *stress* e pode interferir com uma reprodução fiável. Os peixes devem ser alimentados duas vezes por dia, durante todo o período de confinamento e durante a fase de exposição, com náuplios de artémia, complementados, se necessário, com um alimento floculado disponível no mercado. Para iniciar o ensaio, considera-se necessário um mínimo de 42 casais reprodutores (54 se for necessário um controlo com solvente, devido, em parte, à falta de dados históricos para justificar o recurso apenas a este controlo), de modo a garantir uma replicação adequada. Além disso, há que verificar, para cada casal reprodutor da geração F0, se se trata de um casal XX-XY (apresentando, para cada sexo, a configuração normal de cromossomas sexuais), para evitar a possível inclusão de machos espontâneos XX (ver ponto 39).
19. Durante a fase de aclimação, a mortalidade nos peixes de cultura deve ser registada e devem aplicar-se os critérios seguintes após um período de adaptação de 24 horas:
 - Mortalidade superior a 10 % da população na cultura nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: rejeitar o lote completo;
 - Mortalidade entre 5 % e 10 % da população nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: aclimação durante um período complementar de sete dias após o período de aclimação de duas semanas; se a mortalidade for superior a 5 % durante o segundo período de sete dias, rejeitar o lote completo;
 - Mortalidade inferior a 5 % da população nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: aceitar o lote.

20. Os peixes não devem receber tratamento em caso de doença durante o período de aclimação de duas semanas que precede o ensaio e durante o período de exposição, devendo evitar-se completamente, se possível, qualquer tratamento. Os peixes com sinais clínicos de doença não devem ser utilizados no estudo. Deve manter-se um registo das observações e de eventuais tratamentos profiláticos e terapêuticos durante o período de cultura anterior ao ensaio.
21. A fase de exposição deve ser iniciada com adultos sexualmente dimórficos, geneticamente sexuados, provenientes de uma população laboratorial de animais sexualmente maduros criados a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os peixes devem ser identificados como reprodutores comprovados (ou seja, que tenha produzido descendência viável) durante a semana que antecede a exposição. Para todo o grupo de peixes utilizados no ensaio, o intervalo de pesos individuais por sexo no início do ensaio deve ser mantido a $\pm 20\%$ da média aritmética do peso dos indivíduos do mesmo sexo. Antes do ensaio, deve proceder-se à pesagem de uma subamostra de peixes para estimar o peso médio. Os peixes selecionados devem ter pelo menos 12 spf e ter um peso $\geq 300\text{ mg}$ para as fêmeas e $\geq 250\text{ mg}$ para os machos.

CONCEÇÃO DO ENSAIO

Concentrações de ensaio

22. Recomenda-se a utilização de cinco concentrações do produto químico em estudo, para além do(s) controlo(s). Todas as fontes de informação devem ser tidas em conta aquando da seleção da gama de concentrações de ensaio: relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR), dados estabelecidos pelo método de referências cruzadas, resultados de ensaios com peixes, nomeadamente de mortalidade aguda (capítulo C.1 do presente anexo), de reprodução a curto prazo (capítulo C.48 do presente anexo) e outros métodos de ensaio – por exemplo, capítulos C.15, C.37, C.41, C.47 ou C.49 do presente anexo (21) (22) (23) (24) (25) (26), se disponíveis, ou, se necessário, os resultados de um ensaio de determinação da gama das concentrações que inclua, se possível, uma fase de reprodução. Se for necessário um ensaio para determinar a gama de concentrações, pode ser efetuado em condições (qualidade da água, sistema de ensaio, carga animal) semelhantes às utilizadas para o ensaio definitivo. Caso seja necessário utilizar um solvente e não existam dados históricos disponíveis, pode utilizar-se o ensaio de determinação da gama de concentrações para identificar a adequação do solvente. A concentração máxima de ensaio não deve exceder a solubilidade em água, 10 mg/l ou $1/10$ da CL50-96 horas (27). A concentração mais baixa deve ser 10 a 100 vezes inferior à concentração mais elevada. A utilização de cinco concentrações permite não só medir as relações dose-resposta, como também indica a concentração mínima com efeito observável (LOEC) e a NOEC,

necessárias para a avaliação dos riscos em determinados programas regulamentares ou contextos jurídicos. Em geral, o fator de espaçamento entre as concentrações nominais do produto químico em estudo entre níveis de tratamento adjacentes é $\leq 3,2$.

Replicados no âmbito dos grupos de tratamento e dos controlos

23. Devem utilizar-se, no mínimo, seis câmaras de ensaio replicadas por cada concentração de ensaio (ver o apêndice 7). Durante a fase de reprodução (exceto para a geração F0), a estrutura de replicação é duplicada para a avaliação da fecundidade, utilizando-se em cada replicado apenas um casal reprodutor (ver ponto 42).
24. Para além da série de concentrações do produto químico em estudo, deve utilizar-se um controlo com água de diluição e, se necessário, um controlo com solvente. Para assegurar um nível adequado de representatividade estatística, deve duplicar-se o número de câmaras de replicação para os controlos (ou seja, devem utilizar-se pelo menos doze replicados para os controlos). Durante a fase de reprodução, o número de replicados nos controlos é duplicado (ou seja, 24 replicados no mínimo, cada um com apenas um casal reprodutor). Após a reprodução, os replicados dos controlos não devem conter mais de 20 embriões (peixes).

PROCEDIMENTO

Início do ensaio

25. Os peixes sexualmente ativos utilizados para iniciar a geração F0 do ensaio são selecionados com base em dois critérios: a idade (normalmente mais de 12 spf, mas de preferência não mais de 16 spf) e o peso (≥ 300 mg para as fêmeas e ≥ 250 mg para os machos).
26. Os pares macho-fêmea que satisfazem as especificações acima indicadas são transferidos como casais individualizados para as cubas destinadas a receber os replicados, ou seja, doze replicados nos controlos e seis replicados nos grupos tratados com o produto químico no início do ensaio. As cubas são atribuídas aleatoriamente a um tratamento (por exemplo, T1-T5 e controlo) e a um replicado (por exemplo, A-L nos controlos e A-F em tratamento), sendo depois colocadas no sistema de exposição com o débito adequado para cada cuba.

Condições de exposição

27. O apêndice 3 apresenta um resumo completo dos parâmetros e condições do ensaio. O respeito destas especificações deve traduzir-se nos controlos por valores medidos semelhantes aos enumerados no apêndice 4.

28. Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em, pelo menos, um recipiente de ensaio para cada grupo de tratamento e para o grupo de controlo. Estas medições, com exceção da temperatura, devem ser efetuadas, no mínimo, uma vez por semana durante o período de exposição. A temperatura da água ao longo de todo o estudo deve situar-se, em média, entre 24 °C e 26 °C e deve ser medida todos os dias durante o período de exposição. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a $\pm 0,5$ unidades de pH. Os replicados no âmbito de um tratamento, bem como os grupos de tratamento no âmbito do ensaio, não devem diferir estatisticamente uns dos outros (com base nas temperaturas medidas diariamente e excluindo eventuais afastamentos de curta duração).

Duração da exposição

29. O teste expõe os peixes sexualmente aptos à reprodução a partir da geração F0 durante três semanas. Na semana 4 (aproximadamente no dia 24 do ensaio), é estabelecida a geração F1 e os casais reprodutores F0 são eutanasiados, sendo registado o seu peso e comprimento (ver ponto 34). A geração F1 é depois exposta durante mais de 14 semanas (15 semanas no total para F1) e a geração F2 é exposta durante duas semanas até à eclosão. A duração total do ensaio é, em princípio, de 19 semanas (ou seja, até à eclosão da geração F2). A cronologia das operações é apresentada no quadro 2 e explicada em pormenor no apêndice 9.

Regime alimentar

30. Os peixes podem ser alimentados *ad libitum* com *Artemia* spp. (náuplios com 24 horas de vida), complementadas, se necessário, com alimentos floculados disponíveis no mercado. Estes devem ser regularmente analisados para garantir que não estão contaminados com pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) ou bifenilos policlorados (PCB). Devem evitar-se alimentos com um nível elevado de substâncias ativas no sistema endócrino (como fitoestrogénios), que podem comprometer a resposta ao ensaio. Os alimentos não consumidos e as matérias fecais devem ser removidos dos recipientes de ensaio por recurso a um método adequado, por exemplo limpando cuidadosamente o fundo de cada cuba com um sifão. Os lados e o fundo de cada cuba devem também ser limpos uma ou duas vezes por semana (por exemplo, raspando com uma espátula). O apêndice 5 apresenta um exemplo de um regime alimentar. As doses distribuídas baseiam-se no número de peixes por replicado. Por conseguinte, são reduzidas em caso de mortalidade num replicado.

Determinação analítica e medições

31. Antes do início do período de exposição, é necessário verificar o bom funcionamento do sistema de distribuição do produto químico. Devem definir-se todos os métodos analíticos necessários, incluindo o conhecimento suficiente da estabilidade do produto químico no sistema de ensaio. Durante este último, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos adequados, de preferência pelo menos uma vez por semana num replicado para cada grupo de tratamento, mudando todas as semanas de replicado num mesmo grupo de tratamento.
32. Durante o ensaio, os débitos de diluente e de solução-mãe devem ser verificados a intervalos regulares (no mínimo, três vezes por semana). Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, se a concentração do produto químico em estudo em solução tiver sido mantida satisfatoriamente no intervalo de $\pm 20\%$ em relação aos valores médios medidos ao longo de todo o ensaio, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos. No caso de produtos químicos que apresentem uma acumulação marcada nos peixes, as concentrações de ensaio podem diminuir à medida que os peixes crescem. Nesses casos, recomenda-se que a taxa de renovação da solução de ensaio em cada câmara seja adaptada de modo a manter as concentrações de ensaio tão constantes quanto possível.

Observações e parâmetros medidos

33. Os parâmetros medidos são a fecundidade, a fertilidade, a eclosão, o crescimento e a sobrevivência, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos a nível da população. Também devem ser feitas observações diárias do comportamento, havendo que registar quaisquer comportamentos anómalos. Os níveis hepáticos de ARNm *vtg* ou de proteína VTG medidos por imunoensaio (28), os marcadores sexuais fenotípicos – como as papilas da barbatana anal características do macho –, a avaliação histológica do sexo gonadal e a avaliação histopatológica dos rins, do fígado e das gónadas (ver lista de parâmetros no quadro 1) constituem outros parâmetros mecanísticos. Todos estes parâmetros específicos são avaliados no contexto da determinação do sexo genético do indivíduo baseada na presença ou na ausência do gene *dmy*, que determina o sexo masculino no peixe-do-arroz-japonês (ver ponto 41). Além disso, é também avaliado o tempo necessário para a desova. Podem igualmente obter-se rácios sexuais fenotípicos simples utilizando as informações provenientes das contagens de papilas da barbatana anal para definir os indivíduos como macho ou fêmea do ponto de vista fenotípico. Não se espera que o método de ensaio detete desvios ligeiros em relação ao rácio sexual previsto, uma vez que o número relativamente reduzido de peixes por replicado não proporciona uma representatividade estatística suficiente. Além disso, durante a avaliação histopatológica,

as gónadas são avaliadas e são realizadas análises muito mais potentes para determinar o fenótipo gonadal no contexto do sexo genético.

34. O principal objetivo do presente método de ensaio consiste em avaliar os potenciais efeitos de um produto químico em estudo numa determinada população. Os parâmetros mecanísticos (VTG, CSS e determinados efeitos histopatológicos nas gónadas) podem também ajudar a determinar se existe um efeito mediado pela atividade endócrina. No entanto, estes parâmetros de ordem mecanística também podem ser influenciados pela toxicidade sistémica ou outras toxicidades. Deste modo, é possível avaliar em pormenor a histopatologia hepática e renal, a fim de melhor compreender as eventuais respostas a nível dos parâmetros mecanísticos. No entanto, mesmo que não se proceda a estas avaliações pormenorizadas, as anomalias visíveis observadas acidentalmente durante a avaliação histopatológica têm, na mesma, de ser registadas e notificadas.

Eutanásia dos peixes

35. No final da exposição das gerações F0 e F1, aquando da recolha de uma subamostra de peixes subadultos, os peixes devem ser eutanasiados com quantidades adequadas de uma solução anestésica (por exemplo, metanossulfonato de triclaína, MS-222 (n.º CAS 886-86-2), 100-500 mg/l) tamponada com 300 mg/l de NaHCO₃ (bicarbonato de sódio, n.º CAS 144-55-8), para reduzir a irritação da membrana mucosa. Se os peixes apresentarem sinais de sofrimento considerável (muito graves, com morte previsível) e se considerar estarem moribundos, devem ser anestesiados e eutanasiados e tratados como mortalidade para efeitos de análise de dados. Quando um peixe for eutanasiado devido a morbilidade, o facto deve ser registado e notificado. Consoante o momento do estudo em que o peixe é eutanasiado, pode ser removido para uma análise histopatológica (fixando o peixe para possível histopatologia).

Manuseamento dos ovos e das larvas

Colheita de ovos dos casais reprodutores para a reprodução da geração seguinte

36. A colheita dos ovos é efetuada no primeiro dia (ou nos primeiros dois dias, se necessário) da semana de ensaio 4, entre a F0 e a F1, e da semana de ensaio 18, entre a F1 e a F2. A semana de ensaio 18 corresponde a peixes adultos da geração F1, de 15 spf. É importante que todos os ovos sejam retirados de cada cuba no dia anterior ao início da colheita dos ovos, para garantir que todos os ovos recolhidos de um casal reprodutor são provenientes de uma única desova. Após a desova, o peixe-do-arroz-japonês fêmea transporta, por vezes, os seus ovos junto da cloaca até que os possa depositar num substrato. Na ausência de um substrato na cuba, os ovos podem ser encontrados junto à fêmea ou no fundo da

cuba. Consoante a sua localização, os ovos são retirados cuidadosamente da fêmea ou sifonados do fundo da cuba na semana de ensaio 4 de F0 e na semana de ensaio 18 da F1. Todos os ovos recolhidos no âmbito de um tratamento são reunidos antes de serem distribuídos pelas câmaras de incubação.

37. Os filamentos que mantêm os ovos postos juntos devem ser removidos. Os ovos fecundados (até 20) são recolhidos de cada casal reprodutor (um casal por replicado), agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática por câmaras de incubação adequadas (apêndices 6 e 7). Utilizando um bom microscópio de dissecação, é possível observar as marcas do início da fecundação/desenvolvimento, tais como a elevação da membrana de fertilização (cório), a divisão celular em curso ou a formação da blástula. As câmaras de incubação podem ser colocadas em «aquários de incubação» separados para cada tratamento (nos quais, neste caso, devem ser medidos os parâmetros de qualidade da água e as concentrações do produto químico em estudo) ou no aquário de replicados que conterá as larvas eclodidas (por exemplo, eleuteroembriões). Se for necessário um segundo dia de colheita (23.º dia de ensaio), todos os ovos de ambos os dias devem ser reunidos e redistribuídos de forma sistemática por cada um dos replicados de tratamento.

Criação de ovos até à eclosão

38. Os ovos fecundados são continuamente agitados, por exemplo, por bolhas de ar dentro da incubadora ou por oscilação vertical da mesma. A mortalidade dos ovos fecundados (embriões) é verificada e registada diariamente. Os ovos mortos são retirados das incubadoras (apêndice 9). No 7.º dia pós-fecundação (dpf), a agitação é interrompida ou reduzida de tal modo que os ovos fecundados se depositem na base da incubadora. Promove-se assim a eclosão, normalmente no dia seguinte ou no segundo dia. Para cada tratamento e controlo, contam-se os alevins (larvas juvenis; eleuteroembriões), agrupando os replicados. Os ovos fecundados que não tenham eclodido ao fim de duas vezes o período médio de eclosão no controlo (normalmente 16 ou 18 dpf) são considerados não viáveis e rejeitados.
39. Transferem-se doze alevins para cada cuba replicada. Os alevins provenientes das câmaras de incubação são reunidos e distribuídos sistematicamente pelas cubas replicadas (apêndice 7). Para tal, pode seleccionar-se de forma aleatória um alevim do lote de tratamento e acrescentar sequencialmente um alevim retirado aleatoriamente para um aquário de replicação. Cada cuba deve conter um número igual ($n=12$) das larvas eclodidas (no máximo 20 larvas cada). Se não houver um número suficiente de alevins para preencher todos os replicados expostos ao tratamento, recomenda-se assegurar que o maior número possível de replicados contém 12 alevins. Estes podem ser manipulados com

segurança utilizando pipetas de vidro de grande diâmetro. Os alevins suplementares são eutanasiados com um anestésico. Nas semanas anteriores à constituição dos casais reprodutores, é necessário registrar o dia em que se observa o primeiro evento de desova em cada replicado.

Constituição dos casais reprodutores

Corte das barbatanas e determinação do sexo genotípico

40. A determinação do sexo genotípico através do corte das barbatanas é efetuada às 9-10 spf (ou seja, semanas de ensaio 12-13 para a geração F1). Todos os peixes de uma cuba são anestesiados por recurso a métodos aprovados – por exemplo, IACUC – e é retirada uma pequena amostra de tecido da extremidade dorsal ou ventral da barbatana caudal de cada peixe, para determinar o sexo genotípico do indivíduo (29). Os peixes de um replicado podem ser alojados em pequenas gaiolas, se possível um por gaiola, na cuba replicada. Em alternativa, podem ser mantidos dois peixes em cada gaiola, se forem distinguíveis uns dos outros. Um método consiste em efetuar cortes diferenciais na barbatana caudal (por exemplo, um na extremidade dorsal e outro na ventral) aquando da recolha da amostra de tecido.
41. O sexo genotípico do peixe-do-arroz-japonês é determinado por um gene identificado e sequenciado (*dmy*), situado no cromossoma Y. A presença do *dmy* indica um indivíduo XY, seja qual for o fenótipo, enquanto a ausência de *dmy* indica um indivíduo XX, independentemente do fenótipo (30); (31). Extraí-se ácido desoxirribonucleico (ADN) de cada corte de barbatana; a presença ou ausência de *dmy* pode ser determinada por métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) [ver apêndice 9 no capítulo C.41 do presente anexo ou os apêndices 3 e 4 em (29)].

Definição de casais reprodutores

42. Para definir casais reprodutores XX-XY, utiliza-se a informação sobre o sexo genotípico, independentemente do fenótipo externo, que pode ser alterado por exposição a um produto químico em estudo. No dia seguinte à determinação do sexo genotípico de cada peixe, são selecionados aleatoriamente dois peixes XX e dois peixes XY de cada replicado e definidos dois casais reprodutores XX-XY. Se um replicado não contiver dois peixes XX ou dois XY, convém encontrar peixes adequados noutros replicados no âmbito do tratamento. A prioridade consiste em obter o número recomendado de replicados de casais reprodutores (12) para cada tratamento e nos controlos (24). Os peixes com anomalias evidentes (problemas de bexiga natatória, malformações espinais, variações de tamanho extremas, etc.) devem ser excluídos aquando da constituição de casais reprodutores.

Durante a fase de reprodução para a geração F1, cada cuba replicada deve conter apenas um casal reprodutor.

Amostragem de subadultos e avaliação dos parâmetros

Amostragem de casais não reprodutores

43. Após a constituição dos casais reprodutores, os peixes não selecionados para reprodução são eutanasiados para a medição dos parâmetros de subadultos na semana de ensaio 12-13 (F1). É extremamente importante que os peixes sejam manuseados de forma a que o sexo genotípico determinado para a seleção dos casais reprodutores continue a poder ser associado a um determinado indivíduo. Todos os dados recolhidos são analisados em função do sexo genotípico do peixe específico. Cada peixe é utilizado para determinar diversos parâmetros, nomeadamente as taxas de sobrevivência dos peixes juvenis/subadultos [semanas de ensaio 7-12/13 (F1)], o aumento do comprimento (pode ser medido o comprimento padrão se a barbatana caudal tiver sido reduzida devido à amostragem para análise do sexo genético; mede-se o comprimento total se apenas tiver sido recortada uma parte da barbatana caudal, dorsal ou ventral, para *dmy*) e a massa corporal (ou seja, peso húmido, peso enxuto), o ARNm *vtg* (ou VTG) hepático e as papilas da barbatana anal (ver quadros 1 e 2). Note-se que, para calcular o crescimento médio num grupo de tratamento, são também necessários o peso e o comprimento dos casais reprodutores.

Recolha de amostras de tecido e medição da vitelogenina

44. O fígado é dissecado e deve ser armazenado a ≤ -70 °C até à medição do ARNm *vtg* (ou da VTG). A cauda do peixe, incluindo a barbatana anal, é conservada num fixador adequado (por exemplo, de Davidson) ou fotografada de modo a que seja possível contar, posteriormente, as papilas da barbatana anal. É também possível recolher amostras de outros tecidos (por exemplo, gónadas), se assim se pretender, e conservá-los. A concentração de VTG hepática deve ser quantificada por uma técnica ELISA homóloga (ver os procedimentos recomendados para o peixe-do-arroz-japonês no apêndice 6, capítulo C.48, do presente anexo). Como alternativa, a Agência de Proteção do Ambiente dos EUA estabeleceu os métodos para a quantificação do ARNm *vtg*, ou seja, a extração do ARNm do gene *vtg I* de uma amostra hepática e a quantificação do número de cópias do gene *vtg I* (por ng do ARNm total) por PCR quantitativa (29). Para determinar o número de cópias do gene *vtg* nos grupos de controlo e de tratamento, um método mais económico em termos de recursos e menos difícil do ponto de vista técnico consiste em determinar a variação relativa (fator multiplicativo) na expressão do gene *vtg I* entre os grupos de controlo e de tratamento.

Características sexuais secundárias

45. Em circunstâncias normais, só os peixes-do-arroz-japoneses machos sexualmente maduros têm papilas, que se desenvolvem nas placas de junção de determinados raios da barbatana anal e constituem uma característica sexual secundária, podendo servir de biomarcador para efeitos desreguladores do sistema endócrino. O apêndice 8 apresenta o método de contagem das papilas da barbatana anal (número de placas de junção com papilas). O número de papilas da barbatana anal por indivíduo também é utilizado para classificar os indivíduos como fenótipo externo macho ou fêmea e para estabelecer, assim, um rácio sexual simples para cada replicado. Um peixe-do-arroz-japonês com um número superior a zero é definido como macho; um peixe-do-arroz-japonês com zero papilas da barbatana anal é definido como fêmea.

Avaliação da fecundidade e da fertilidade

46. A fecundidade e a fertilidade são avaliadas nas semanas de ensaio 1 a 3 na geração F0 e nas semanas de ensaio 15 a 17 na geração F1. Os ovos são recolhidos diariamente de cada casal reprodutor durante 21 dias consecutivos, sendo retirados com cuidado de sob o ventre das fêmeas (colocadas numa rede) e/ou sifonados do fundo do aquário todas as manhãs. Tanto a fecundidade como a fertilidade são registadas diariamente para cada casal reprodutor de replicação. A fecundidade é definida como o número de ovos postos e a fertilidade é definida funcionalmente como o número de ovos fecundados e viáveis no momento da contagem. Esta deve ser efetuada o mais rapidamente possível após a colheita dos ovos.
47. A fecundidade dos replicados é registada diariamente como o número de ovos por casal reprodutor, que é analisado pelos procedimentos estatísticos recomendados utilizando os meios de replicação. A fertilidade dos replicados é a soma do número de ovos férteis produzidos por um casal reprodutor dividido pela soma do número de ovos produzidos por esse casal. Estatisticamente, a fertilidade é analisada como um rácio por replicado. A taxa de eclosão dos replicados corresponde ao número de alevins dividido pelo número de embriões carregados (normalmente 20). Estatisticamente, a taxa de eclosão é analisada como rácio por replicado.

Amostragem de adultos e avaliação dos parâmetros

Amostragem de casais reprodutores

48. Após a semana de ensaio 17 (ou seja, após se iniciar com êxito da geração F2), os adultos F1 são eutanasiados e são avaliados vários parâmetros (ver quadros 1 e 2). A barbatana anal é examinada para avaliar as papilas (ver apêndice 8) e/ou a cauda é retirada ao nível

imediatamente posterior à cloaca e fixada para contagem posterior das papilas. Uma parte da barbatana caudal pode ser recolhida e neste momento e conservada para efeitos de verificação do sexo genético (*dmy*), se desejado. Se necessário, pode ser colhida uma amostra de tecido para repetir a análise *dmy*, a fim de verificar o sexo genético de um peixe específico. A cavidade corporal é aberta para permitir uma perfusão com um fixador adequado (por exemplo, de Davidson), antes da imersão do corpo inteiro no fixador. No entanto, se for efetuada uma etapa de permeabilização adequada antes da fixação, não é necessário abrir a cavidade corporal.

Histopatologia

49. Cada peixe é objeto de uma avaliação histológica que visa detetar patologias no tecido gonadal (30) (29). Como se indica no ponto 33, outros parâmetros mecanísticos avaliados neste ensaio (por exemplo, VTG, CSS e determinados efeitos histopatológicos gonadais) podem ser influenciados por toxicidade sistémica ou outros tipos de toxicidade. Deste modo, é possível avaliar em pormenor a histopatologia hepática e renal, a fim de melhor compreender as eventuais respostas a nível dos parâmetros mecanísticos. No entanto, mesmo que não se efetuem estas avaliações pormenorizadas, as anomalias visíveis observadas acidentalmente durante a avaliação histopatológica têm, na mesma, de ser registadas e notificadas. Pode ponderar-se uma «leitura descendente», começando pelo grupo de tratamento mais elevado (em comparação com o controlo) e terminando num tratamento sem efeito; contudo, recomenda-se a consulta das orientações relativas à histopatologia (29). Regra geral, todas as amostras são processadas/preparadas antes de serem examinadas pelo patologista. Caso se opte por uma «leitura descendente», importa salientar que o procedimento de Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) se baseia na expectativa de um aumento do impacto biológico (da patologia) à medida que as doses aumentam. Por conseguinte, deixa de se poder considerar apenas uma dose única elevada sem quaisquer doses intermédias. Esta abordagem é aceitável se não for necessário proceder a uma análise estatística para determinar que a dose elevada não tem qualquer efeito. O fenótipo gonadal decorre também desta avaliação.

Outras observações

50. O ensaio MEOGRT fornece dados que podem ser utilizados (por exemplo, numa abordagem baseada na análise do ónus da prova) para avaliar simultaneamente pelo menos dois tipos gerais de vias determinantes dos efeitos nocivos (AOP) que resultam numa perturbação da função reprodutora: a) vias de mediação endócrina com perturbação do eixo endócrino hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG); e b) vias que provocam reduções da sobrevivência, do crescimento (comprimento e peso) e da reprodução através de toxicidade de mediação não endócrina. Os parâmetros geralmente medidos em ensaios de toxicidade

crónica, como o ensaio ao longo do ciclo de vida completo e o ensaio nas primeiras fases da vida, são também determinados no presente ensaio e podem ser utilizados para avaliar os perigos inerentes aos modos de ação tóxica de mediação não endócrina e às vias de toxicidade de mediação endócrina. Durante o ensaio, devem fazer-se observações diárias do comportamento, havendo que registar quaisquer comportamentos anómalos. Além disso, deve registar-se a mortalidade e calcular-se a sobrevivência até à seleção dos peixes (semana de ensaio 6/7), a sobrevivência desde a seleção até à amostragem de subadultos (9-10 spf) e a sobrevivência desde a constituição dos casais até à amostragem de peixes adultos.

Quadro 1: Síntese dos parâmetros do ensaio MEOGRT*

Fase da vida	Parâmetro	Geração
Embrião (2 spf)	Eclosão (% e tempo até à eclosão)	F1, F2
Juvenil (4 spf)	Sobrevivência	F1
Subadulto (9 ou 10 spf)	Sobrevivência	F1
	Crescimento (comprimento e peso)	
	Vitelogenina (ARNm ou proteína)	
	Características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal)	
	Rácio sexual externo	
	Tempo até à 1. ^a desova	
Adulto (12-14 spf)	Reprodução (fecundidade e fertilidade)	F0, F1
Adulto (15 spf)	Sobrevivência	F1
	Crescimento (comprimento e peso)	
	Características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal)	
	Histopatologia (gónadas, fígado, rins)	

*Estes parâmetros devem ser objeto de análise estatística

CRONOLOGIA

51. O quadro 2 ilustra a cronologia do ensaio MEOGRT, o qual MEOGRT inclui 4 semanas de exposição de adultos F0 e 15 semanas de exposição da geração F1, assim como um período de exposição da segunda geração (F2), até à eclosão (2 spf). O apêndice 9 recapitula as diferentes etapas do ensaio, do início ao fim do ensaio MEOGRT.

Quadro 2: Cronologia da exposição e dos parâmetros avaliados durante o ensaio MEOGRT.

MEOGRT: cronologia da exposição e dos parâmetros																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Semana de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Fase de vida					Embrião			Larva			Juvenil			Subadulto		Adulto			
Parâmetros																			
Fecundidade	F ₀														F ₁				
Fertilidade	F ₀														F ₁				
Eclosão					F ₁														F ₂
Sobrevivência						F ₁					F ₁							F ₁	
Crescimento				F ₀							F ₁							F ₁	
Vitelogenina											F ₁								
Car. sex. secundárias											F ₁							F ₁	
Histopatologia																		F ₁	
Semana de ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<ul style="list-style-type: none"> • A concepção experimental tem 7 grupos de replicados <ul style="list-style-type: none"> ○ 5 para tratamentos com o produto químico em estudo ○ 2 para os tratamentos de controlo (4 se se utilizar solvente) • Concepção intragrupo <ul style="list-style-type: none"> ○ 12 replicados para reprodução, patologia adulta e CSS (sem. 10 a 18) ○ 6 replicados para eclosão, sobrevivência e vtg; e CSS e crescimento de subadultos (sem. 1 a 9) <p>CSS: caracteres sexuais secundários; sem: semanas; vtg: vitelogenina</p>																			

COMUNICAÇÃO DE DADOS

Análise estatística

52. Uma vez que o sexo genotípico é determinado para todos os peixes do ensaio, importa analisar os dados separadamente para cada sexo genotípico (por exemplo, machos XY e fêmeas XX). O incumprimento desta exigência reduzirá, em grande medida, a representatividade estatística de qualquer análise. É preferível efetuar as análises estatísticas seguindo os procedimentos descritos no documento da OCDE sobre os métodos atuais de análise estatística dos dados de ecotoxicidade (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (32). O apêndice 10 fornece mais orientações nesta matéria.

53. A concepção do ensaio e a seleção dos testes estatísticos devem assegurar a possibilidade de para detetar alterações de importância biológica nos parâmetros, sempre que seja

necessário comunicar uma NOEC (32). O registo das concentrações efetivas e dos parâmetros pertinentes pode ser condicionado pelo quadro regulamentar aplicável. Convém identificar, para cada parâmetro, a percentagem de variação que importa detetar ou estimar. A conceção experimental deve ser adaptada tendo isso em conta. É improvável que ocorra a mesma variação percentual em todos os parâmetros e que seja possível conceber uma experiência realizável passível de satisfazer os referidos critérios para todos os parâmetros. Por conseguinte, a experiência deve ser concebida de modo a concentrar-se adequadamente nos parâmetros que sejam importantes no seu contexto. O apêndice 10 contém um fluxograma estatístico e orientações para facilitar o tratamento dos dados e a escolha do teste estatístico ou do modelo mais adequado a utilizar. Podem utilizar-se outras abordagens estatísticas, desde que sejam cientificamente justificadas.

54. É necessário analisar as variações em cada série de replicados, efetuando uma análise de variância ou recorrendo a tabelas de contingência, e utilizar métodos de análise estatística suficientes com base nessa análise. A fim de efetuar uma comparação múltipla entre os resultados obtidos para cada concentração e os resultados obtidos com os controlos, recomenda-se um procedimento descendente (por exemplo, o teste de Jonckheere-Terpstra) para respostas contínuas. Se os dados não forem compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona, utiliza-se o teste de Dunnett ou o teste de Dunn (após uma adequada transformação dos dados, se necessário).
55. No que respeita à fecundidade, as contagens de ovos são diárias, mas podem ser analisadas na sua globalidade ou como uma medida repetida. O apêndice 10 descreve pormenorizadamente como analisar este parâmetro. No caso dos dados histopatológicos expressos na forma de índices de gravidade, foi desenvolvido um novo teste estatístico, o Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Devem comunicar-se todos os parâmetros observados nos tratamentos químicos que difiram significativamente dos controlos adequados.

Considerações relativas à análise dos dados

Utilização de níveis de tratamento comprometidos

57. Há que ter em conta vários fatores para determinar se um replicado ou um tratamento completo apresenta sinais de toxicidade manifesta e deve ser excluído da análise. A toxicidade manifesta caracteriza-se por uma mortalidade > 4 indivíduos num replicado entre 3 spf e 9 spf que não possa ser explicada por um erro técnico. As hemorragias, os comportamentos anormais, a natação anormal, a anorexia e quaisquer outros sinais clínicos de doença constituem outros sinais de toxicidade manifesta. No caso de sinais subletais de

toxicidade, pode ser necessário proceder a avaliações qualitativas, que devem ser sempre efetuadas tendo por referência o grupo de controlo para a água de diluição (apenas água limpa). Caso surja uma toxicidade manifesta no(s) grupo(s) de tratamento mais exposto(s), recomenda-se que esses tratamentos sejam excluídos da análise.

Controlos com solvente

58. A utilização de um solvente só se deve ponderar em último recurso, após terem sido analisadas todas as outras opções de administração do produto químico. Caso se utilize um solvente, é necessário incluir no ensaio um controlo para a água de diluição. No final do ensaio, deve efetuar-se uma avaliação dos efeitos potenciais do solvente. Para tal, efetua-se uma comparação estatística dos resultados do grupo de controlo com solvente com os do grupo de controlo com água de diluição. Os parâmetros mais importantes a ter em conta nesta análise são os fatores determinantes do crescimento (peso), já que podem ser afetados em caso de toxicidade generalizada. Se se detetarem diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros entre o grupo de controlo com água de diluição e o grupo de controlo com solvente, deve recorrer-se ao parecer de um perito para determinar se a validade do ensaio está comprometida. Se os dois controlos diferirem, os grupos expostos ao produto químico devem ser comparados com o controlo com solvente, a menos que se saiba que é preferível compará-los com o controlo com água de diluição. Caso não haja diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de controlo, recomenda-se que os grupos expostos ao produto químico em estudo sejam comparados com os dois grupos de controlo em conjunto (controlo com solvente e controlo com água de diluição), exceto se se souber que é preferível compará-los, quer com o grupo de controlo com água de diluição, quer com o grupo de controlo com solvente.

Relatório de ensaio

59. O relatório de ensaio deve incluir os seguintes elementos:

Produto químico em estudo: natureza física e propriedades fisico-químicas pertinentes

- Dados de identificação química.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, solubilidade na água e outras propriedades fisico-químicas pertinentes;
- identificação química, como o nome IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, a pureza, a identidade química das impurezas, se necessário e exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for caso disso).

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

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

Espécie utilizada no ensaio

- Nome científico, estirpe (se conhecida), origem e método de recolha dos ovos fecundados e posterior manuseamento.

Condições de ensaio

- Fotoperíodo(s);
- Conceção do ensaio (por exemplo, tamanho da cuba, volume de água e material, número de câmaras de ensaio e replicados, número de alevins por replicado);
- Método de preparação das soluções-mãe e frequência da renovação (sempre que se utilizem agentes solubilizantes, a sua concentração deve ser indicada);
- Método de dosagem do produto químico em estudo (por exemplo, bombas, sistemas de diluição);
- Eficiência de recuperação do método e valores nominais das concentrações de ensaio, limite de quantificação, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e respetivos desvios-padrão; método de obtenção desses desvios e médias, bem como elementos comprovativos de que as medições correspondem às concentrações do produto químico em estudo perfeitamente dissolvido;
- Características da água de diluição: pH, dureza, temperatura, concentração do oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), carbono orgânico total (idem), sólidos em suspensão (idem), salinidade do meio de ensaio (idem) e quaisquer outras medições efetuadas;
- Os valores nominais das concentrações de ensaio, as médias dos valores medidos e os respetivos desvios-padrão;
- Qualidade da água nos recipientes de ensaio, pH, temperatura (diariamente) e concentração de oxigénio dissolvido;
- Informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo, tipo de alimentos, origem, quantidade distribuída e frequência).

Resultados:

- Provas de que os controlos cumpriram os critérios de validação globais;

- Dados relativos ao grupo de controlo (mais o controlo com o solvente, se utilizado) e aos grupos de tratamento: eclosão (taxa de eclosão e tempo até à eclosão) para F1 e F2, sobrevivência após a eclosão para F1, crescimento (comprimento e peso corporal) para F1, sexo genotípico e diferenciação sexual (por exemplo, características sexuais secundárias baseadas nas papilas da barbatana anal e na histologia gonadal) para F1, sexo fenotípico para F1, características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal) para F1, ARNm *vtg* (ou proteína VTG) para F1, avaliação histopatológica (gónadas, fígado e rins) para F1 e reprodução (fecundidade e fertilidade) para F0, F1 (ver quadros 1 e 2);
 - Abordagem de análise estatística (análise de regressão ou da variância) e tratamento dos dados (testes e modelos estatísticos utilizados);
 - Concentração sem efeitos observáveis (NOEC) para cada resposta avaliada;
 - Concentração mínima com efeito observável (LOEC) para cada resposta avaliada (a $p=0,05$); CE_x para cada resposta avaliada, se aplicável, e intervalos de confiança (90 % ou 95 %, por exemplo), gráfico do modelo ajustado utilizado para a calcular a CE_x , declive da curva concentração-resposta, fórmula do modelo de regressão e estimativa dos parâmetros do modelo e dos respetivos erros-padrão.
 - Qualquer desvio em relação ao presente método de ensaio e aos critérios de aceitação, bem como considerações relativas às eventuais consequências do resultado do ensaio.
60. No que diz respeito aos resultados das medições dos parâmetros, devem apresentar-se os valores médios e os respetivos desvios-padrão (por replicado e por concentração, se possível).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71–80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to

- 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.
- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Disponível em: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to

Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.

- (20) Capítulo C.15 do presente anexo: Ensaio de toxicidade de curto prazo nos peixes em estado embrionário e recém-nascidos.
- (21) Capítulo C.37 do presente anexo: Ensaio a 21 dias em peixes: Despistagem a curto prazo de atividade estrogénica e androgénica e de inibição da aromatase.
- (22) Capítulo C.41 do presente anexo, Ensaio de desenvolvimento sexual em peixes.
- (23) Capítulo C.48 do presente anexo, Ensaio de reprodução a curto prazo em peixes.
- (24) Capítulo C.47 do presente anexo, Ensaio de toxicidade nos primeiros estádios de vida em peixes.
- (25) Capítulo C.49 do presente anexo, Ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.

- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Produto químico: Uma substância ou mistura.

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática.

Fecundidade: Número de ovos.

Fertilidade: Número de ovos viáveis/fecundidade.

Comprimento à furca (CF): O comprimento medido da extremidade do focinho até à extremidade dos raios centrais da barbatana caudal, utilizado nos peixes quando é difícil perceber onde termina a coluna vertebral (www.fishbase.org).

Taxa de eclosão: Alevins/número de embriões carregados numa incubadora

IACUC: Comité Institucional para o Cuidado e a Utilização de Animais.

Comprimento normalizado (CN): O comprimento do peixe medido da extremidade do focinho até à extremidade posterior da última vértebra ou à extremidade posterior da parte lateral média da placa hipural. Por outras palavras, esta medida exclui o comprimento da barbatana caudal (www.fishbase.org).

Comprimento total (CT): O comprimento da extremidade do focinho até à extremidade do lobo mais longo da barbatana caudal, normalmente medido com os lobos espalmados no prolongamento da linha média. A medida faz-se em linha reta, sem seguir a curva do corpo (www.fishbase.org).

Uma imagem idêntica era apresentada na anterior alteração ao REG 440/2008 (ENV-2016-80003, parte 4), capítulo C.47, Apêndice 1, e pode ser reutilizada

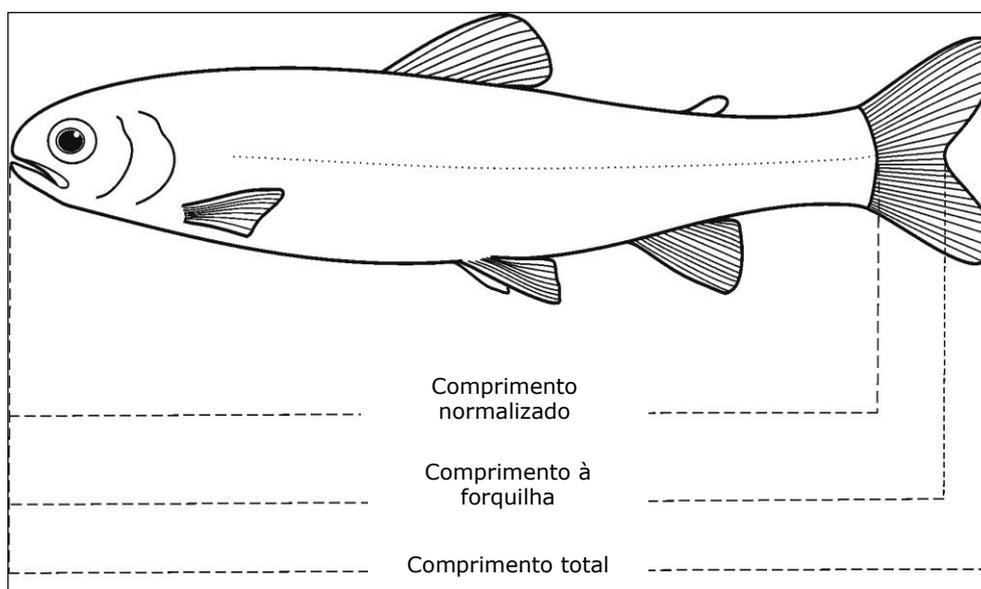


Figura 1: Descrição dos diferentes comprimentos utilizados

CE_x (Concentração efetiva com x % de efeito): concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente a um grupo de controlo. Por exemplo, a CE₅₀ é a concentração estimada que produz efeitos num parâmetro do ensaio em 50 % de uma população exposta durante um determinado período de exposição.

Ensaio de fluxo contínuo: Ensaio com fluxo contínuo de soluções de ensaio através do sistema de ensaio durante o período de exposição.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Taxa de carga: Peso húmido de peixe por volume de água.

Concentração mínima com efeito observável (LOEC): A menor concentração de ensaio de um produto químico em estudo para a qual se observa um efeito significativo ($p < 0,05$), comparativamente com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior aos observados com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC). Os apêndices 5 e 6 contêm orientações neste domínio.

Concentração letal média (CL₅₀): A concentração de um produto químico em estudo que se estima ser letal para 50 % dos organismos sujeitos ao ensaio durante o ensaio.

Concentração sem efeito observável (NOEC): A concentração de ensaio imediatamente abaixo da LOEC que, comparativamente ao grupo de controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), num determinado período de exposição.

SMILES: Especificação de escrita molecular linear simplificada (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Densidade de ocupação: Número de peixes por volume de água.

Produto químico em estudo: 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.

VTG: A vitelogenina é uma fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo, que normalmente ocorre nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

spf: Semanas após a fertilização

Apêndice 2**ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL**

Substância	Concentração limite
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados totais e dos bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsênio	1 µg/l
Crômio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

Apêndice 3**CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA O MEOGRT**

1. Espécie recomendada	Peixe-do-arroz-japonês (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	A temperatura nominal de ensaio é de 25 °C. A temperatura média durante o ensaio em cada cuba é de 24-26 °C.
4. Qualidade da iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espectro largo e ~150 lúmenes/m ²) (~150 lux). 16 h de luz e 8 h de escuridão
6. Taxa de carga	F0: 2 adultos/replicado; F1: iniciada com um máximo de 20 ovos (embriões)/replicado, reduzidos para 12 embriões/replicado na eclosão e, depois, 2 adultos (casal reprodutor XX-XY) às 9-10 spf para a fase de reprodução
7. Volume útil mínimo das câmaras de ensaio	1,8 l (exemplo de dimensão da câmara de ensaio: 18x9x15 cm)
8. Renovação da solução de ensaio, em volume	Máximo de 5 renovações em volume/dia até 16 renovações em volume/dia (ou débito de 20 ml/min)
9. Idade dos organismos de ensaio no início	F0: > 12 spf, não devendo, de preferência, exceder 16 spf
10. Número de organismos por replicado	F0: 2 peixes (par macho-fêmea); F1: máximo 20 peixes (ovos)/replicado (produzidos por casais reprodutores F0 e F1).
11. Número de tratamentos	5 tratamentos com o produto químico em estudo mais controlo(s) adequado(s)
12. Número de replicados por tratamento	Mínimo de 6 replicados por tratamento para o produto químico em estudo e mínimo de 12 replicados para o controlo, bem como para o controlo com solvente, se utilizado (o número de replicados é duplicado na fase de reprodução na geração F1)
13. Número de organismos por ensaio	Mínimo de 84 peixes na geração F0 e 504 na geração F1 (se for utilizado controlo com solvente, 108 peixes para F0 e 648 peixes para F1). A unidade contabilizada é o pós-eleuteroembrião.
14. Regime alimentar	Os peixes são alimentados <i>ad libitum</i> com <i>Artemia</i> spp. (náuplios com 24 horas de vida), complementadas, se necessário, com um alimento

- floculado disponível no mercado (o apêndice 6 contém um exemplo de um regime alimentar que garante um crescimento e um desenvolvimento adequados para uma reprodução sustentada).
15. Arejamento Nenhum, exceto se o oxigénio dissolvido se aproximar de valores < 60 % do valor de saturação no ar
16. Água de diluição Água limpa de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada.
17. Período de exposição Em princípio 19 semanas (da F0 à eclosão da F2)
18. Parâmetros biológicos (primários) Taxa de eclosão (F1 e F2); sobrevivência (F1, desde a eclosão até 4 spf (fim das larvas/início dos juvenis), entre 4 e 9 (ou 10) spf (início de juvenis até subadultos) e entre 9 e 15 spf (de subadultos até à eutanásia dos adultos)); crescimento (F1, comprimento e peso às 9 e 15 spf); características sexuais secundárias (F1, papilas da barbatana anal às 9 e 15 spf); vitelogenina (F1, ARNm *vlg* ou proteína VTG às 15 spf); sexo fenotípico (F1, via histologia das gónadas às 15 spf); reprodução (F0 e F1, fecundidade e fertilidade durante 21 dias); tempo até à desova (F1) e histopatologia (F1, gónada, fígado e rins às 15 spf)
19. Critérios de validade do ensaio Oxigénio dissolvido ≥ 60 % do valor da saturação no ar; temperatura média da água de 24-26 °C durante todo o ensaio; reprodução bem-sucedida ≥ 65 % de fêmeas no(s) controlo(s); fecundidade média diária ≥ 20 ovos no(s) controlo(s); taxa de eclosão ≥ 80 % (média) nos controlos (em cada uma das gerações F1 e F2); sobrevivência após a eclosão até às 3 spf ≥ 80 % (média) e a partir das 3 spf até à eutanásia para a geração ≥ 90 % (média) nos controlos (F1), as concentrações do produto químico em estudo em solução devem ser mantidas satisfatoriamente dentro de um intervalo de ± 20 % em relação aos valores médios medidos.

Apêndice 4

ORIENTAÇÕES SOBRE OS VALORES TÍPICOS OBTIDOS NOS CONTROLOS

Note-se que os valores seguintes obtidos nos controlos se baseiam num número limitado de estudos de validação, podendo ser alterados à luz da nova experiência adquirida.

Crescimento

O peso e o comprimento são medidos para todos os peixes amostrados às 9 (ou 10) e às 15 semanas pós-fecundação (spf). De acordo com este protocolo, o peso húmido previsto às 9 spf é de 85-145 mg, para os machos, e de 95-150 mg, para as fêmeas. O peso esperado às 15 spf é de 250-330 mg para os machos e de 280-350 mg para as fêmeas. Embora se possam registar desvios significativos em relação a estes intervalos para determinados peixes, um peso médio nos controlos que se afaste substancialmente destes intervalos, sobretudo se for inferior, sugere problemas relacionados com a alimentação, o controlo da temperatura, a qualidade da água, doenças ou uma combinação destes fatores.

Eclosão

A taxa de eclosão nos controlos é tipicamente de cerca de 90 %. No entanto, não são raros valores próximos dos 80 %. Uma taxa de eclosão inferior a 75 % pode indicar uma agitação insuficiente dos ovos durante o desenvolvimento ou cuidados insuficientes no seu manuseamento, como a remoção tardia dos ovos mortos, que leva a uma infestação fúngica.

Sobrevivência

As taxas de sobrevivência até às 3 spf após a eclosão e após 3 spf são, em geral, de 90 % ou mais para os controlos, mas não são excessivas as taxas de sobrevivência próximas dos 80 % nas fases iniciais de vida, para os controlos. As taxas de sobrevivência em controlos inferiores a 80 % são motivo de preocupação e podem indicar uma limpeza insuficiente dos aquários, conduzindo à perda de larvas por doença ou asfixia devido aos baixos níveis de oxigénio dissolvido. A mortalidade pode também resultar de lesões durante a limpeza das cubas e da perda de larvas no sistema de drenagem das cubas.

Gene da vitelogenina

Embora os níveis absolutos do gene da *vitelogenina* (*vtg*), expressos em cópias/ng de ARNm total, possam variar consideravelmente entre laboratórios devido aos procedimentos ou instrumentos utilizados, o rácio de *vtg* deve ser cerca de 200 vezes superior nas fêmeas de controlo em relação aos machos de controlo. Não é invulgar que este rácio atinja níveis de 1 000 a 2 000; contudo, rácios inferiores a 200 são suspeitos e podem indicar problemas de contaminação das amostras ou problemas ligados ao procedimento e/ou aos reagentes utilizados.

Características sexuais secundárias

Para os machos, o intervalo normal de características sexuais secundárias, definidas como o número total de segmentos com papilas nos raios da barbatana anal, é de 40-80 segmentos às 9-10 spf. Às 15 spf, o intervalo deve ser de cerca de 80-120, para os machos de controlo, e de 0, para as fêmeas de controlo. Por motivos não elucidados, em casos raros, alguns machos não apresentam papilas às 9 spf, mas como todos os machos de controlo desenvolvem papilas até às 15 spf, tal resulta provavelmente de um atraso no desenvolvimento. A presença de papilas nas fêmeas de controlo indica a presença de machos XX na população.

Machos XX

A incidência normal de machos XX nos peixes de cultura parece ser, no máximo, da ordem dos 4 %, a 25 °C, aumentando a incidência com o aumento da temperatura. Devem tomar-se medidas para limitar a proporção de machos XX na população. Uma vez que a incidência destes parece ter um componente genético e é, por conseguinte, hereditária, um meio eficaz de reduzir a sua incidência na população consiste em vigiar a população da cultura e assegurar que os machos XX não são utilizados para reprodução.

Atividade de desova

A atividade de desova nos replicados de controlo deve ser monitorizada diariamente antes da avaliação da fecundidade. Os casais de controlo podem ser avaliados visualmente do ponto de vista qualitativo para evidência da atividade de reprodução. Às 12-14 spf, a maioria dos casais de controlo deve desovar. Um número reduzido de casais a desovar nesta altura indica possíveis problemas de saúde, maturidade ou bem-estar dos peixes.

Fecundidade

Às 12-14 spf, as fêmeas do peixe-do-arroz-japonês de boa saúde e bem alimentadas põem geralmente 15 a 50 ovos por dia. A produção de ovos recomendada para 16 dos 24 casais reprodutores de controlo (> 65 %) deve exceder os 20 ovos por casal, por dia, podendo atingir cerca de 40 ovos por dia. Uma produção inferior pode indicar problemas de imaturidade, de malnutrição ou de falta de saúde dos casais reprodutores.

Fertilidade

A percentagem de ovos férteis nos casais reprodutores de controlo é geralmente da ordem dos 90 %, não sendo raros valores de 95 % ou superiores. As taxas de fertilidade inferiores a 80 % nos ovos de controlo são suspeitas e podem indicar indivíduos não saudáveis ou condições de cultura inferiores ao desejável.

Apêndice 5

EXEMPLO DE REGIME ALIMENTAR

O quadro 1 apresenta um regime alimentar que assegura um crescimento e um desenvolvimento adequados para uma reprodução sustentada. São aceitáveis eventuais desvios a este regime alimentar, mas recomenda-se que sejam testados para verificar se as taxas de crescimento e de reprodução são aceitáveis. Para aplicar o regime alimentar proposto, é necessário, antes do início do ensaio, determinar o peso enxuto de artêmias por volume de pasta semilíquida das mesmas. Isso pode ser feito pesando um determinado volume desta pasta após tê-la secado durante 24 horas a 60 °C em recipientes previamente pesados. Para ter em conta o peso dos sais na pasta semilíquida, convém secar e pesar também um volume idêntico da solução salina utilizada na pasta semilíquida, e subtrair o peso do sal do peso obtido para a pasta de artêmias seca. Uma alternativa consiste em filtrar e enxaguar as artêmias com água destilada antes de as secar, eliminando assim a necessidade de medir o peso de uma amostra que contenha apenas sal. Esta informação é utilizada para converter as informações do quadro de peso enxuto de artêmias em volume de puré semilíquido de artêmias a administrar aos peixes. Além disso, recomenda-se que sejam pesadas, todas as semanas, as alíquotas de pasta de artêmias para verificar se o peso enxuto administrado está correto.

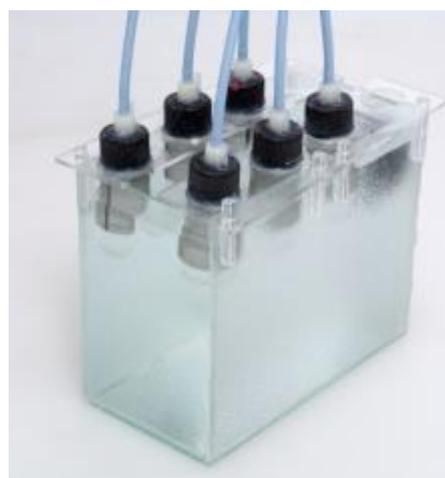
Quadro 1: Exemplo de regime alimentar

Tempo (após a eclosão)	Artémias (mg peso enxuto/peixe/dia)
Dia 1	0,5
Dia 2	0,5
Dia 3	0,6
Dia 4	0,7
Dia 5	0,8
Dia 6	1,0
Dia 7	1,3
Dia 8	1,7
Dia 9	2,2
Dia 10	2,8
Dia 11	3,5
Dia 12	4,2
Dia 13	4,5
Dia 14	4,8
Dia 15	5,2
Dias 16-21	5,6
Semana 4	7,7
Semana 5	9,0
Semana 6	11,0
Semana 7	13,5
Semana 8-eutanásia	22,5

Apêndice 6

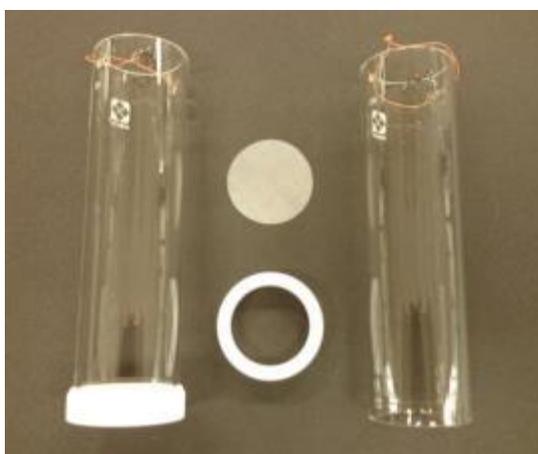
EXEMPLOS DE CÂMARAS DE INCUBAÇÃO DE OVOS

Exemplo A



Esta incubadora é constituída por um tubo de centrifugação de vidro com um corte transversal, ligado por uma manga de aço inoxidável e sustido pela tampa de rosca da centrifugadora. Um pequeno tubo em vidro ou em aço inoxidável atravessa a tampa e é posicionado perto do fundo redondo, garantindo uma difusão suave das bolhas de ar para colocar os ovos em suspensão e reduzir a transmissão entre os ovos de infeções fúngicas por organismos saprofiticos e facilitando simultaneamente as trocas químicas entre a incubadora e a cuba onde está colocada.

Exemplo B



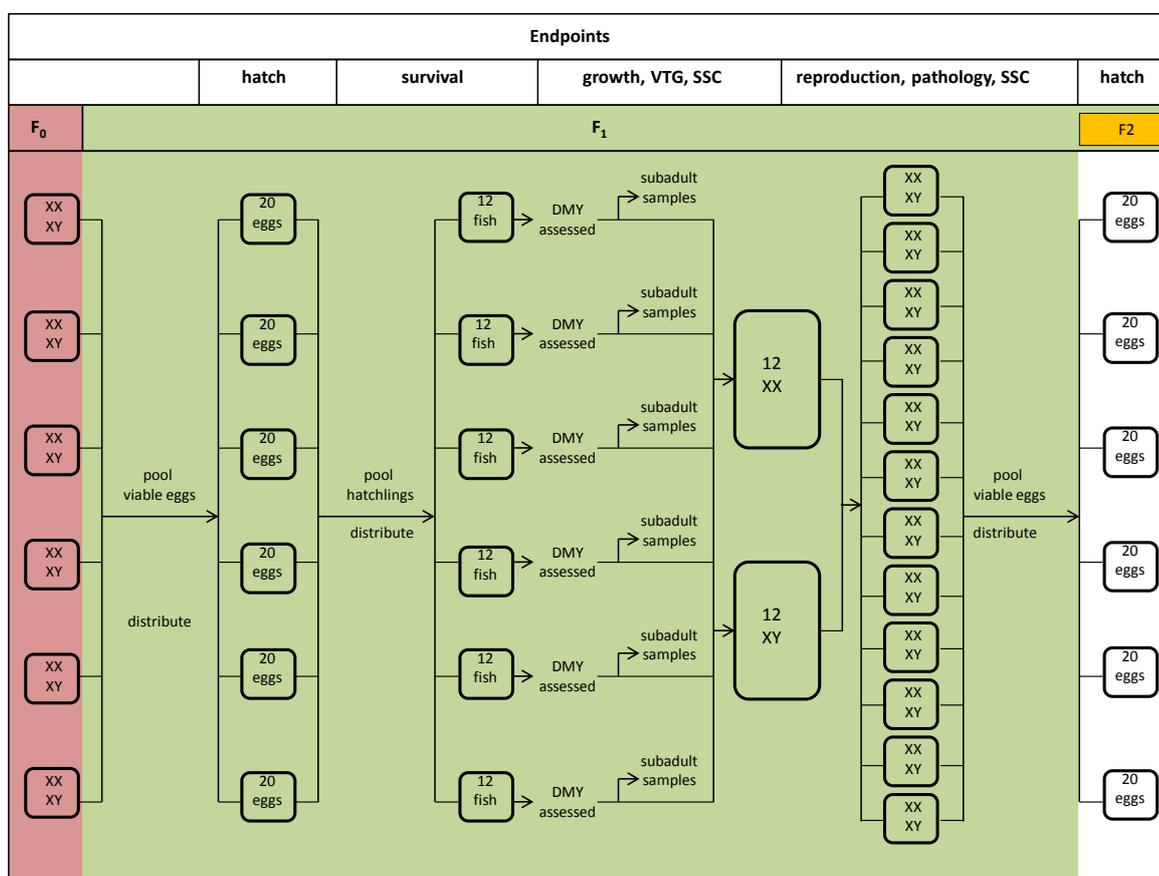


Esta incubadora é constituída por um corpo cilíndrico de vidro (5 cm de diâmetro e 10 cm de altura) e por uma grelha metálica em aço inoxidável (0,25 ϕ e 32 mesh), mantida no fundo do corpo cilíndrico com um anel em PTFE. As incubadoras são suspensas por uma barra de movimento vertical sobre as cubas e agitadas verticalmente (aproximadamente 5 cm de amplitude) num ciclo adequado aos ovos de peixe-do-arroz-japonês (aproximadamente uma vez a cada 4 segundos).

Apêndice 7

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO AGRUPAMENTO E DA REPARTIÇÃO DE REPLICADOS DURANTE O MÉTODO DE ENSAIO MEOGRT

Figura 1: Agrupamento e repartição de replicados durante o MEOGRT. A figura representa um tratamento ou 1/2 controlo. Devido ao agrupamento, a identidade dos replicados não é contínua ao longo do ensaio. Note-se que o termo «ovos» designa ovos fecundados viáveis (equivalente a embriões).



Parâmetros

eclosão	sobrevivência	crescimento, VTG, SSC	reprodução, patologia, SSC	eclosão
ovos viáveis	ovos nascimentos	peixes avaliados DMY subadultos	amostras	ovos viáveis
distribuição	ovos distribuição	peixes avaliados DMY subadultos	amostras	ovos viáveis

Tratamentos e replicação

O presente método de ensaio recomenda cinco tratamentos com o produto químico em estudo utilizando material de qualidade técnica e um controlo negativo. O número de replicados por tratamento não se mantém constante ao longo do MEOGRT e o número de replicados no grupo de controlo é duas vezes mais elevado do que em qualquer um dos grupos de tratamento. Na geração F0, cada grupo tratado com o produto químico em estudo compreende seis replicados, ao passo que o grupo de controlo negativo tem 12 replicados. O recurso a solventes é fortemente desaconselhado, mas, se forem utilizados, essa utilização e a escolha do solvente devem justificar-se no relatório de ensaio. Além disso, se for utilizado um solvente, são necessários dois tipos de controlos: a) um controlo com solvente e b) um controlo negativo. Estes dois grupos de controlo devem conter, cada um deles, todos os replicados previstos nas diferentes etapas do ensaio MEOGRT. Esta estrutura de replicação permanece inalterada durante todo o desenvolvimento do organismo de ensaio na geração F1 (e F2 até a eclosão). No entanto, na fase adulta, quando os casais reprodutores F1 são constituídos, o número de replicados de casais reprodutores por tratamento deve ser duplicado para otimizar os resultados; por conseguinte, existem até 12 casais replicados por grupo tratado com o produto químico em estudo e 24 casais replicados no grupo de controlo (assim como 24 casais replicados no grupo de controlo com solvente, se necessário). A determinação da eclosão dos embriões reproduzidos pelos casais F1 é efetuada com base na mesma estrutura de replicação utilizada para os embriões dos casais F0, ou seja, inicialmente seis replicados por grupo tratado pelo produto químico em estudo e 12 replicados no(s) grupo(s) de controlo.

Apêndice 8

CONTAGEM DAS PAPILAS DA BARBATANA ANAL

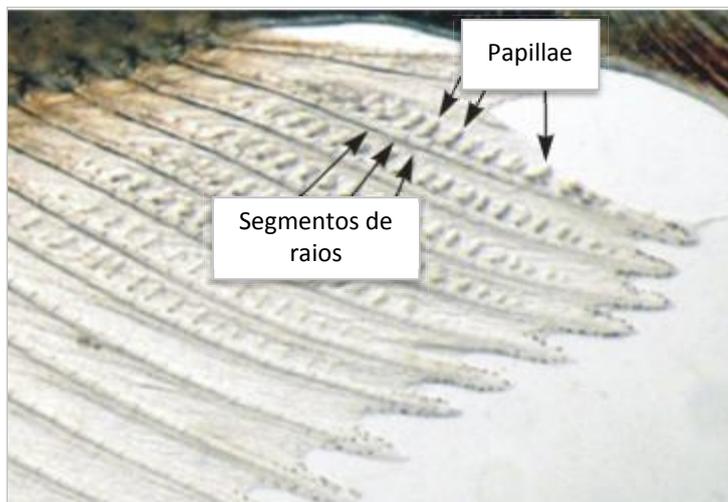
Principais materiais e reagentes

- Microscópio de dissecação (com câmara fotográfica facultativa);
- Fixador (por exemplo, de Davidson (o líquido de Bouin não é recomendado), se a contagem não for efetuada por imagem

Procedimentos

Após a necrópsia, convém obter uma imagem da barbatana anal de modo a permitir a contagem conveniente das papilas. Embora a imagiologia seja o método recomendado, a barbatana pode ser fixada com fixador de Davidson ou outro fixador adequado, durante cerca de 1 minuto. É importante mantê-la espalmada durante a fixação, para facilitar a contagem das papilas. A carcaça com a barbatana anal pode ser armazenada em fixador de Davidson ou noutro fixador adequado, até ser analisada. Contar o número de placas de junção (ver **figura 1**) com papilas salientes ao nível do rebordo posterior da placa.

Figura 1: Papilas da barbatana anal



Apêndice 9

CRONOLOGIA PORMENORIZADA DO ENSAIO MEOGRT

Semanas de ensaio 1-3 (F0)

Os peixes reprodutores da geração F0 que tenham cumprido os critérios de seleção (ver pontos 16 a 20) são expostos durante três semanas, para permitir a exposição dos gametas e dos tecidos gonadais em desenvolvimento ao produto químico em estudo. Cada cuba replicada contém um único casal reprodutor (casal fêmea XX-macho XY). Os ovos postos são recolhidos, contados e avaliados para efeitos de fertilidade durante 21 dias consecutivos, a partir do 1.º dia de ensaio.

Semana de ensaio 4 (F0 e F1)

É preferível que os ovos fecundados e viáveis (embriões) sejam recolhidos num único dia; no entanto, se não existirem embriões suficientes, podem ser recolhidos em dois dias. Neste caso, todos os embriões do mesmo tratamento que tenham sido recolhidos no primeiro dia são agrupados com os embriões recolhidos no segundo dia. Em seguida, a totalidade dos embriões agrupados para cada tratamento é distribuída aleatoriamente pelas incubadoras de replicação, a uma razão de 20 embriões por incubadora. A mortalidade dos ovos fecundados (embriões) é verificada e registada diariamente. Os ovos mortos são removidos das incubadoras (a morte de ovos fecundados pode ser identificada, em especial numa fase precoce, por uma diminuição acentuada da transparência e por uma alteração da coloração provocadas pela coagulação e/ou precipitação de proteínas, que se traduz num aspeto branco opaco; OCDE 210).

Nota: Se um único tratamento exigir um segundo dia de colheita, todos os tratamentos (incluindo os controlos) têm de seguir este procedimento. Se, após o segundo dia de colheita, o número de embriões no âmbito de um tratamento não for suficiente para permitir colocar 20 embriões por incubadora, reduz-se para 15 o número de embriões por incubadora nesse tratamento específico. Se não houver embriões suficientes para colocar 15 por incubadora, reduz-se o número de incubadoras de replicação até que haja embriões em número suficiente para colocar 15 por incubadora. Além disso, é possível aumentar o número de casais reprodutores por tratamento e por grupo de controlo, na geração F0, para produzir mais ovos e alcançar o número recomendado de 20 por replicado.

No 24.º dia de ensaio, os casais reprodutores F0 são eutanasiados, registando-se o seu peso e o seu comprimento. Se necessário, é possível proporcionar mais um ou dois dias aos casais reprodutores F0, a fim de recomeçar a geração F1.

Semanas de ensaio 5-6 (F1)

Um ou dois dias antes do início previsto da eclosão, deve-se parar ou reduzir a agitação dos

ovos em incubação para acelerar aquele processo. À medida que os ovos vão eclodindo, dia após dia, os alevins são agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática pelas cubas de replicação destinadas às larvas no âmbito de cada tratamento específico, sendo que cada cuba não deve conter mais de 12 alevins. A distribuição é efetuada de forma aleatória; selecionam-se os alevins, que são colocados um a um em replicados sucessivos de forma aleatória e passando pela mesma ordem de um replicado de tratamento para o seguinte, até que todos os replicados no âmbito do tratamento tenham 12 alevins. Se não houver um número suficiente de alevins para preencher todos os replicados, é necessário garantir que o maior número possível de replicados contém 12 alevins para iniciar a fase F1.

Os ovos que não tenham eclodido ao fim de um período duplo do dia de eclosão médio no controlo são considerados não viáveis e rejeitados. O número de alevins é registado, calculando-se o êxito da eclosão (taxa de eclosão) em cada replicado.

Semanas de ensaio 7-11 (F1)

A sobrevivência das larvas é controlada e registada diariamente em todos os replicados. Ao 43.º dia de ensaio, regista-se o número de peixes sobreviventes em cada replicado, bem como o número inicial de alevins colocados no replicado (valor nominal: doze). Deste modo, é possível calcular a percentagem de sobrevivência desde a eclosão até à fase subadulta.

Semanas de ensaio 12-13 (F1)

Entre o 78.º e o 85.º dia de ensaio, retira-se uma pequena amostra da barbatana caudal de cada peixe para determinar o sexo genotípico do indivíduo. Estes dados são utilizados para constituir os casais reprodutores.

Nos três dias seguintes à determinação do sexo genotípico de cada peixe, constituem-se, aleatoriamente, 12 casais reprodutores por tratamento e 24 casais por controlo. Dois peixes XX e XY de cada replicado são selecionados aleatoriamente e agrupados por sexo e, em seguida, selecionados aleatoriamente para constituir os casais reprodutores (casais XX-XY). São constituídos, no mínimo, 12 replicados por tratamento e, no mínimo, 24 replicados para os controlos, com um casal reprodutor por replicado. Se, num replicado, não for possível agrupar dois peixes XX ou dois peixes XY, devem colocar-se peixes com o sexo genotípico adequado noutros replicados no âmbito do tratamento.

Os restantes peixes (máximo de 8 peixes por replicado) são eutanasiados e amostrados para a medição dos vários parâmetros na fase subadulta. Os dados relativos ao gene *dmy* (XX ou XY), para todas as amostras subadultas, são conservados com vista a garantir a possibilidade de associar todos os parâmetros medidos ao sexo genético de cada indivíduo.

Semanas de ensaio 13-14 (F1)

A exposição prossegue à medida que os casais reprodutores subadultos evoluem até à fase adulta. No 98.º dia de ensaio (ou seja, no dia anterior ao início da colheita dos ovos), os ovos são retirados dos aquários e das fêmeas.

Semanas de ensaio 15-17 (F1)

Os ovos postos são recolhidos diariamente durante 21 dias consecutivos em cada replicado e avaliados quanto à fecundidade e à fertilidade.

Semana de ensaio 18 (repetição da semana de ensaio 4) (F1 e F2)

No 120.º dia de ensaio, durante a manhã, procede-se à colheita dos ovos em cada cuba replicada. Os ovos recolhidos são avaliados e os ovos fecundados (filamentos removidos) de cada um dos casais reprodutores são agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática pelas câmaras de incubação, com 20 ovos fecundados por incubadora. Estas podem ser colocadas em cubas para incubadoras, disponibilizadas para cada tratamento, ou na cuba replicada, que conterà as larvas após a eclosão. É preferível que os embriões sejam recolhidos num único dia; no entanto, se não existirem embriões suficientes, podem ser recolhidos em dois dias. Neste caso, todos os embriões do mesmo tratamento que tenham sido recolhidos no primeiro dia são agrupados com os embriões recolhidos no segundo dia. Em seguida, a totalidade dos embriões assim agrupados para cada tratamento é distribuída aleatoriamente pelas incubadoras de replicação, a uma razão de 20 embriões por incubadora. Se um único tratamento exigir um segundo dia de colheita, todos os tratamentos (inclusive os controlos) têm de seguir este procedimento. Se, após o segundo dia de colheita, o número de embriões no âmbito de um tratamento não for suficiente para permitir colocar 20 embriões por incubadora, reduz-se para 15 o número de embriões nesse tratamento específico. Se não houver embriões suficientes para carregar 15 por incubadora, reduz-se o número de incubadoras de replicação até que haja embriões suficientes para carregar 15 por incubadora.

No 121.º dia de ensaio (ou no 122.º dia de ensaio, para garantir o início correto da F2), os casais reprodutores F1 são eutanasiados e analisados quanto aos parâmetros na fase adulta. Se necessário, é possível proporcionar mais um ou dois dias aos casais reprodutores F1, a fim de recomeçar a geração F2.

Semanas de ensaio 19-20 (F2)

Um ou dois dias antes do início previsto da eclosão, deve-se parar ou reduzir a agitação dos ovos em incubação para acelerar aquele processo. Se o ensaio terminar com a eclosão da geração F2, os alevins são contados todos os dias e rejeitados. Os embriões que não tenham eclodido após um período de incubação prolongado, definido como duas vezes o tempo médio da eclosão nos controlos, são considerados não viáveis.

Apêndice 10

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tipos de dados biológicos gerados aquando do ensaio MEOGRT não são específicos deste ensaio; com exceção dos dados de patologia, foram desenvolvidos muitos métodos estatísticos adequados para analisar corretamente dados semelhantes em função das respetivas características, incluindo a normalidade, a homogeneidade da variância, se a conceção do estudo se presta a testes de hipótese ou análises de regressão, ensaios paramétricos *versus* ensaios não paramétricos, etc. Regra geral, as análises estatísticas propostas respeitam as recomendações da OCDE em matéria de dados de ecotoxicidade (OCDE 2006). A figura 2 apresenta um fluxograma decisional para a análise dos dados do ensaio MEOGRT.

Parte-se do princípio de que, na maior parte dos casos, os conjuntos de dados proporcionam respostas monótonas. Além disso, há que ponderar se deve ser utilizado um teste estatístico unilateral ou um teste estatístico bilateral. Sugere-se a utilização de testes unilaterais, a menos que isso não seja adequado por motivos biológicos. Embora a secção seguinte recomende determinados testes estatísticos específicos, se forem estabelecidos métodos estatísticos mais adequados e/ou potentes para aplicação aos dados específicos gerados pelo MEOGRT, esses testes estatísticos devem ser utilizados para beneficiar das vantagens que apresentam.

Os dados MEOGRT devem ser analisados separadamente para cada sexo genotípico. Existem duas estratégias para analisar os dados relativos aos peixes que apresentem inversão sexual (machos XX ou fêmeas XY): 1) Excluir todos os dados relativos aos peixes que apresentem uma inversão sexual ao longo de todo o ensaio, exceto no que se refere à prevalência da inversão sexual em cada replicado; 2) Conservar os dados relativos aos peixes que apresentem uma inversão sexual e proceder à análise com base no sexo genotípico.

Dados histopatológicos

Os dados histopatológicos são registados sob a forma de índices de gravidade, que são avaliados utilizando um procedimento estatístico recentemente desenvolvido – *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices* (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). O ajustamento *Rao-Scott* retém a informação relativa à replicação do ensaio; o procedimento *by Slices* incorpora o pressuposto biológico de que a gravidade dos efeitos tende a aumentar com as concentrações de exposição. Para cada diagnóstico, os resultados do RSCABS indicam os tratamentos que induzem uma prevalência de patologias acrescida em relação aos controlos, bem como o respetivo o grau de gravidade.

Dados relativos à fecundidade

A análise dos dados relativos à fecundidade consiste num procedimento descendente (teste de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) para determinar os efeitos do tratamento, desde que os dados sejam compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona. O procedimento descendente permite fazer comparações a um nível de significância de 0,05, evitando os ajustamentos ligados ao número de comparações efetuadas. Espera-se que os dados sejam compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona, o que pode verificar-se quer através de uma inspeção visual dos dados, quer através da construção de contrastes lineares e quadráticos das médias por tratamento, após uma hierarquização dos dados. A menos que o contraste quadrático seja significativo e o contraste linear não o seja, realiza-se um ensaio de tendências. Caso contrário, recorre-se ao teste de Dunnett para determinar os efeitos dos tratamentos se os dados apresentarem uma distribuição normal e variâncias homogéneas. Se estes requisitos não forem cumpridos, utiliza-se o teste de Dunn com um ajustamento de Bonferonni-Holm. Todos os ensaios são realizados independentemente do teste global F ou de Kruskal-Wallis. Para mais informações, consultar o documento OCDE 2006.

Podem utilizar-se métodos alternativos, como um modelo linear generalizado com erros de Poisson para as contagens de ovos (sem transformação), desde que isso se justifique do ponto de vista estatístico (Cameron e Trividi, 2013). Neste caso, recomenda-se o recurso a um especialista em estatística.

Contagem diária de ovos numa única geração

O modelo ANOVA traduz-se na expressão $Y = \text{tempo} * \text{tempo} + \text{tratamento} + * \text{tratamento} + \text{tempo} * \text{tratamento} + * \text{tempo} * \text{tratamento}$, com os efeitos aleatórios do replicado (geração*tratamento) e tempo*replicado(tratamento), permitindo diferenças componentes de variâncias desiguais de ambos os tipos entre gerações. O termo «tempo» refere-se à frequência das contagens dos ovos (por exemplo, dia ou semana). Trata-se de uma análise de medidas repetidas, em que a correlação entre as observações realizadas com os mesmos replicados dá conta da natureza dos dados enquanto medidas repetidas.

Os principais efeitos dos tratamentos são submetidos ao teste de Dunnett (ou Dunnett-Hsu), que permite ajustar o número de comparações. Estes ajustamentos são necessários para os fatores geração e tempo, uma vez que nenhum deles está associado ao nível do «controlo» e cada par de níveis é potencialmente interessante em termos de comparação. Em ambos os casos, se o teste F para o efeito principal for significativo ao nível 0,05, as comparações por pares entre níveis desse fator podem ser testadas ao nível 0,05 sem ajustamentos suplementares.

O modelo inclui interações a dois ou três fatores, pelo que um efeito principal para o tempo, por exemplo, pode não ser significativo, mesmo que o tempo tenha um impacto significativo nos resultados. Assim, se uma interação a dois ou três fatores que inclua o tempo for significativa ao nível 0,05, podem aceitar-se comparações de níveis de tempo ao nível de significância de 0,05 sem ajustamentos suplementares.

Seguem-se os testes F para a significância do tratamento no tempo, ou seja, as chamadas «fatias» (*slices*) no quadro ANOVA. Se, por exemplo, a fatia correspondente ao tratamento aplicada à geração F1 e ao tempo 12 for significativa ao nível 0,05, as comparações por pares dos tratamentos aplicados à geração F1 e ao tempo 12 podem ser aceites ao nível 0,05 sem mais ajustamentos. Aplicam-se regras semelhantes aos testes relativos ao tempo na geração F1 no âmbito de um tratamento, ou à geração associada a um tempo e a um determinado tratamento.

Por último, as comparações não abrangidas por nenhuma das categorias supramencionadas devem ser ajustadas pelo método de ajustamento dos valores p de Bonferroni-Holm. Para mais informações sobre a análise com esses modelos, consultar Hocking (1985) e Hochberg e Tamhane (1987).

Outro método consiste em recolher os dados brutos e apresentá-los, no relatório do estudo, na forma de fecundidade (número de ovos) por replicado e por dia. Calcula-se a média dos dados brutos por replicado, aplicando-se em seguida, uma transformação de raiz quadrada. Calcula-se uma ANOVA unidirecional aplicada às médias transformadas por replicado, seguida dos contrastes de Dunnett. Pode também ser útil inspecionar visualmente os dados da fecundidade de cada tratamento e/ou replicado num gráfico de pontos que represente a distribuição dos dados ao longo do tempo. Este método permitirá uma avaliação informal dos efeitos potenciais ao longo do tempo.

Todos os outros dados biológicos

As análises estatísticas baseiam-se no pressuposto de que, com uma seleção adequada das doses, os dados serão monótonos. Assim, os dados são assumidos como monótonos, monotonia essa que é formalmente avaliada por recurso a contrastes lineares e quadráticos. Se os dados forem monótonos, recomenda-se a realização de um teste de tendência de Jonckheere-Terpstra sobre as medianas dos replicados (conforme aconselhado em OCDE 2006). Se o contraste quadrático for significativo e o contraste linear não o for, os dados são considerados não monótonos.

Se os dados não forem monótonos, nomeadamente devido a uma resposta reduzida para o tratamento mais elevado ou os dois tratamentos mais elevados, deve ponderar-se excluir todo conjunto de dados, sendo a análise seja efetuada sem esses tratamentos. A decisão terá de ser tomada com base em critérios profissionais e relativamente a todos os dados disponíveis, em especial aqueles que indiquem toxicidade manifesta aos níveis de tratamento em causa.

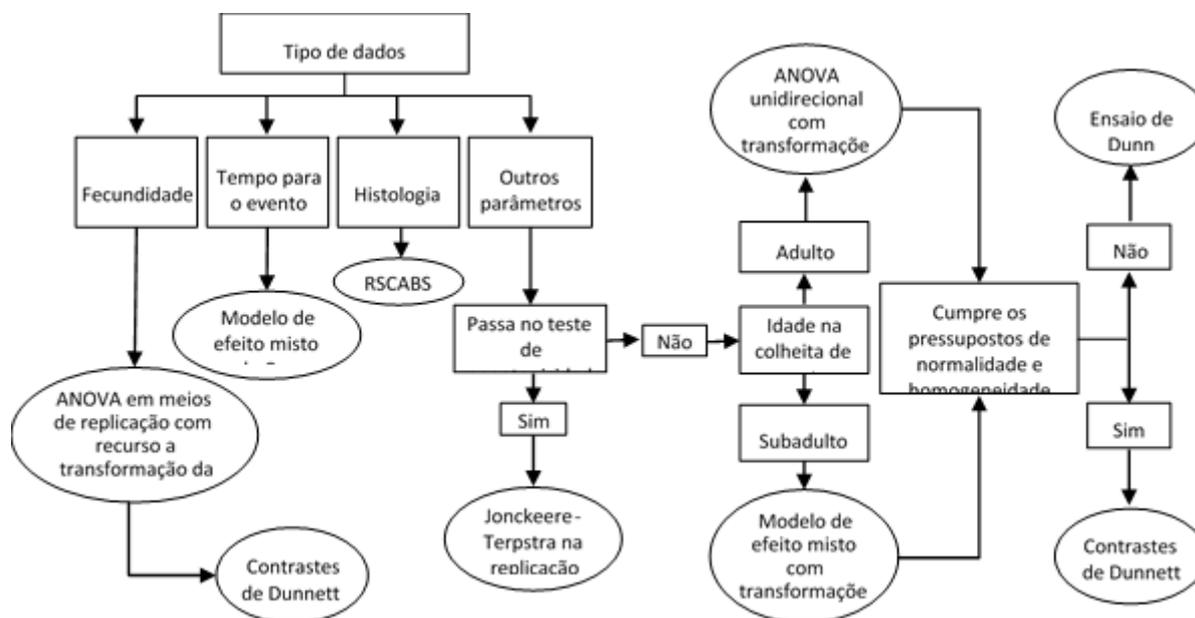
Quanto ao peso e ao comprimento, não são recomendadas transformações, embora possam ser ocasionalmente necessárias. No entanto, recomenda-se aplicar uma transformação logarítmica aos dados relativos à vitelogenina, uma transformação de raiz quadrada aos dados das CSS (papilas da barbatana anal) e uma transformação de arco seno da raiz quadrada aos dados relativos à taxa de eclosão, à percentagem de sobrevivência, ao rácio

sexual e à percentagem de ovos férteis. O tempo até à eclosão e o tempo até à primeira desova devem ser tratados como tempo até ao evento, e os embriões que não ecludam no período definido, bem como os replicados que nunca desovam, devem ser tratados como dados censurados à direita. O tempo até à eclosão deve calcular-se a partir do dia mediano de eclosão de cada replicado. Estes parâmetros devem ser analisados com um modelo de riscos proporcionais de Cox para efeitos mistos.

Os dados biológicos de amostras de adultos são medidos uma vez por replicado, dado existir um peixe XX e um peixe XY por aquário replicado. Por conseguinte, recomenda-se que se aplique uma ANOVA unidirecional às médias dos replicados. Se se verificarem os pressupostos da ANOVA (normalidade e homogeneidade das variâncias – avaliadas, no que diz respeito aos resíduos da ANOVA, pelo teste de Shapiro-Wilks e o teste de Levene, respetivamente), devem utilizar-se os contrastes de Dunnett para determinar os tratamentos que diferem do controlo. Por outro lado, se os pressupostos da ANOVA não se verificarem, deve recorrer-se a um teste de Dunn para determinar que tratamentos diferiram do controlo. Recomenda-se um procedimento semelhante para os dados na forma de percentagens (fertilidade, eclosão e sobrevivência).

Os dados biológicos das amostras de subadultos têm entre 1 e 8 medições por replicado, pelo que podem existir números variáveis de indivíduos que contribuem para a média do replicado de cada sexo genotípico. Por conseguinte, recomenda-se a utilização de um modelo ANOVA com efeitos mistos, seguido de contrastes de Dunnett, caso se verifiquem os pressupostos em matéria de normalidade e de homogeneidade das variâncias (no que diz respeito aos resíduos da ANOVA com efeitos mistos). Se tal não for o caso, deve proceder-se a um teste de Dunn para determinar os tratamentos que diferiram do controlo.

Figura 2: Fluxograma relativo aos procedimentos estatísticos recomendados para a análise dos dados MEOGRT.



Referências bibliográficas

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, Nova Iorque.

C.53 ENSAIO DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE ANFÍBIOS (LAGDA)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente às orientações de ensaio n.º 241 da OCDE (2015). A necessidade de desenvolver e validar um ensaio capaz de identificar e caracterizar as consequências negativas da exposição a produtos químicos tóxicos nos anfíbios surgiu da preocupação de que os níveis ambientais dos produtos químicos possam causar efeitos nocivos nos seres humanos e na fauna selvagem. As orientações de ensaio da OCDE sobre o Ensaio de Crescimento e Desenvolvimento de Larvas de Anfíbios (LAGDA) descrevem um ensaio de toxicidade, realizado com uma espécie de anfíbios, que estuda o crescimento e o desenvolvimento desde a fecundação até ao período juvenil precoce. Trata-se de um ensaio – normalmente com a duração de 16 semanas – que avalia o desenvolvimento inicial, a metamorfose, a sobrevivência, o crescimento e a maturação parcial do sistema reprodutor. Permite, além disso, medir um conjunto de outros parâmetros com vista a uma avaliação diagnóstica de produtos químicos suspeitos de serem perturbadores endócrinos ou de outros tipos de substâncias com efeitos tóxicos para o desenvolvimento e para a reprodução. O método descrito no presente documento é inspirado em trabalhos de validação realizados sobre a rã-de-unhas-africana (*Xenopus laevis*) pela Agência de Proteção do Ambiente dos EUA (U.S. EPA), em cooperação com o Japão (1). Embora outras espécies de anfíbios possam ser adequadas a um protocolo de ensaio sobre o crescimento e o desenvolvimento com capacidade para determinar se o sexo genético é um elemento importante, os métodos e parâmetros específicos descritos no presente método de ensaio são aplicáveis apenas a *Xenopus laevis*.
2. O LAGDA é utilizado como ensaio de nível superior no anfíbio para recolher informações mais abrangentes sobre as relações concentração-resposta em matéria de efeitos nocivos, efeitos esses que podem ser úteis para a identificação e a caracterização dos perigos e para a avaliação do risco ecológico. O ensaio enquadra-se no nível 4 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos, uma vez que os ensaios *in vivo* também fornecem dados sobre efeitos nocivos com base nos parâmetros pertinentes do sistema endócrino (2). O plano experimental genérico implica a exposição de embriões de *X. laevis* na fase de desenvolvimento 8-10 de Nieuwkoop e Faber (NF) (3) a um mínimo de quatro concentrações diferentes do produto químico em estudo (geralmente espaçadas por intervalos definidos segundo uma progressão não logarítmica) e a um ou mais controlos, até 10 semanas após o tempo médio até à fase NF62 no controlo, com uma

subamostra provisória na fase NF62 (≤ 45 dias pós-fecundação; normalmente cerca de 45 dpf). Cada concentração de ensaio é testada em quatro replicados, com oito replicados para controlo. Os parâmetros avaliados durante a exposição (na subamostra provisória e na amostra final no termo do ensaio) incluem os valores indicativos de toxicidade generalizada: mortalidade, comportamento anormal e determinantes de crescimento (comprimento e peso), bem como parâmetros destinados a caracterizar mecanismos de ação específicos dos desreguladores endócrinos que visam os processos fisiológicos mediados por estrogénios, por androgénios e pela tiroide. O método focaliza-se nos potenciais efeitos relevantes para uma população (nomeadamente impactos negativos na sobrevivência, no desenvolvimento, no crescimento e no desenvolvimento do sistema reprodutor), para calcular uma concentração sem efeitos observáveis (NOEC) ou uma concentração efetiva que provoca x % de mudança (CE_x) no parâmetro medido. Importa notar que as abordagens do tipo CE_x só raramente são adequadas para grandes estudos deste tipo, em que o aumento do número de concentrações de ensaio para determinar a CE_x desejada pode ser inviável. De salientar também que o método não abrange a fase de reprodução propriamente dita. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Devido ao número limitado de produtos químicos testados e de laboratórios envolvidos na validação deste método de ensaio bastante complexo, sobretudo no que respeita à reprodutibilidade interlaboratorial – que ainda não se encontra documentada com dados experimentais –, prevê-se que, quando estiver disponível um número suficiente de trabalhos para determinar o impacto desta nova conceção, as orientações de ensaio 241 da OCDE serão reexaminadas e, se necessário, atualizadas à luz da experiência adquirida. O LAGDA é um ensaio importante que permite estudar os fatores suscetíveis de contribuir para um declínio da população de anfíbios, avaliando os efeitos da exposição a produtos químicos durante a fase larvar, em que os efeitos na sobrevivência e no desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento normal dos órgãos reprodutores, podem ter consequências nocivas nas populações.
4. O ensaio foi concebido para detetar o(s) efeito(s) apical(is) resultante(s) de mecanismos endócrinos e não endócrinos, e inclui parâmetros de diagnóstico que são, em parte, específicos dos principais mecanismos endócrinos. Importa notar que, até ao desenvolvimento do LAGDA, não existia nenhum ensaio validado que incidisse nesta função, para os anfíbios.
5. Antes do início do ensaio, é importante dispor de informações sobre as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, nomeadamente para garantir a estabilidade das

soluções químicas produzidas. É também necessário dispor de um método analítico suficientemente sensível para verificar as concentrações do produto químico em estudo. O ensaio dura cerca de 16 semanas e requer um total de 480 animais, nomeadamente embriões de *X. laevis* (ou 640 embriões, caso se utilize um controlo com solvente), para garantir que é suficientemente representativo para avaliar os parâmetros ao nível da população, como o crescimento, o desenvolvimento e a maturação do sistema reprodutor.

6. Antes de utilizar o presente método de ensaio para testar uma mistura para fins regulamentares, convém averiguar se os resultados serão aceitáveis para a finalidade regulamentar pretendida. Além disso, o ensaio não avalia diretamente a fecundidade, podendo, por isso, não ser adequado para utilização numa fase mais avançada do que o nível 4 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos.

BASE CIENTÍFICA DO MÉTODO DE ENSAIO

7. Grande parte dos conhecimentos atuais sobre a biologia dos anfíbios foi obtida utilizando a espécie de laboratório modelo *X. laevis*. Esta espécie pode ser cultivada por rotina em laboratório; a ovulação pode ser induzida por gonadotropina coriônica humana (hCG) e é possível obter facilmente animais no comércio.
8. Tal como acontece com todos os vertebrados, a reprodução em anfíbios é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (4). Os estrogénios e os androgénios são mediadores deste sistema endócrino, controlando o desenvolvimento e a fisiologia dos tecidos sexualmente dimórficos. O ciclo de vida dos anfíbios divide-se em três fases distintas, durante as quais este eixo é particularmente ativo: (1) diferenciação das gónadas durante o desenvolvimento larvar, (2) desenvolvimento das características sexuais secundárias e maturação das gónadas durante a fase juvenil e (3) reprodução funcional dos adultos. Em cada uma destas três fases de desenvolvimento, o sistema endócrino é suscetível de ser perturbado por determinados produtos químicos, como estrogénios e androgénios, o que resulta, *in fine*, numa diminuição da capacidade reprodutiva dos organismos.
9. As gónadas começam a desenvolver-se na fase NF43, altura em que se forma a crista genital bipotencial. A diferenciação das gónadas começa na NF52, quando as células germinais primordiais migram para o tecido medular (machos) ou permanecem na região cortical (fêmeas) das gónadas em desenvolvimento (3). Na década de 1950, foi referido pela primeira vez que este processo de diferenciação sexual das gónadas de *Xenopus* é suscetível de ser alterado pela ação de produtos químicos (5) (6). A exposição dos girinos ao estradiol durante o período de diferenciação das gónadas provoca uma alteração do sexo

nos machos, que se tornam fêmeas plenamente funcionais quando chegam à idade adulta (7) (8). A inversão funcional do sexo das fêmeas em machos também é possível, tendo sido referida a sua ocorrência após a implantação de tecido testicular em girinos (9). No entanto, embora a exposição a um inibidor da aromatase provoque também uma inversão do sexo funcional em *X. tropicalis* (10), este efeito não foi constatado em *X. laevis*. Tradicionalmente, os efeitos de produtos tóxicos na diferenciação das gónadas eram avaliados através do exame histológico das gónadas no momento da metamorfose e a inversão do sexo só podia ser determinada pela análise dos rácios sexuais. Até há pouco tempo, não havia forma de determinar diretamente o sexo genético de *Xenopus*. No entanto, a criação recente de marcadores sexuais em *X. laevis* permite determinar o sexo genético e identificar diretamente os animais cujo sexo foi invertido (11).

10. Nos machos, o desenvolvimento juvenil acompanha o aumento dos níveis de testosterona no sangue, correspondente ao desenvolvimento de características sexuais secundárias, bem como ao desenvolvimento dos testículos. Nas fêmeas, o estradiol é produzido pelos ovários, o que resulta no aparecimento de vitelogenina (VTG) no plasma e de ovócitos vitelogénicos no ovário, assim como no desenvolvimento dos ovidutos (12). Os ovidutos são características sexuais secundárias femininas que intervêm na maturação dos ovócitos durante a reprodução. Os ovócitos são cobertos por um revestimento gelatinoso quando passam pelo oviduto e acumulam-se no ovissaco, prontos para serem fecundados. O desenvolvimento do oviduto parece ser regulado pelos estrogénios, uma vez que está correlacionado com os níveis de estradiol no sangue de *X. laevis* (13) e *X. tropicalis* (12). Foi referido o desenvolvimento de ovidutos nos machos expostos a bifenilos policlorados (14) e 4-*terc*-octilfenol (15).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. A conceção do ensaio implica expor os embriões de *X. laevis* na fase NF8-10, por via aquática, a quatro concentrações diferentes do produto químico em estudo e a um ou mais controlos até 10 semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 no controlo, com uma subamostra intermédia na fase NF62. Embora também seja possível administrar produtos químicos altamente hidrófobos através da alimentação, até à data esta via de exposição foi pouco explorada no contexto do presente ensaio. Cada concentração é testada em quatro replicados, com oito replicados para cada controlo utilizado. Os parâmetros avaliados durante a exposição incluem os indicadores de toxicidade generalizada – mortalidade, comportamento anormal e determinantes de crescimento (comprimento e peso) –, bem como parâmetros concebidos para caracterizar os mecanismos de ação dos perturbadores endócrinos que visam processos fisiológicos

mediados pelos estrogénios, pelos androgénios ou pela tiroide (histopatologia da tiroide, histopatologia das gónadas e do ducto gonadal, desenvolvimento anormal, vitelogenina plasmática – opcional – e rácios sexuais genotípicos/fenotípicos).

CRITÉRIOS DE VALIDADE DO ENSAIO

12. São aplicáveis os seguintes critérios de validade do ensaio:

- A concentração de oxigénio dissolvido deve ser ≥ 40 % do valor da saturação no ar, durante todo o ensaio;
- A temperatura da água deve situar-se no intervalo de 21 ± 1 °C e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 1,0 °C;
- O pH da solução de ensaio deve ser mantido entre 6,5 e 8,5, e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5;
- Os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo em solução foram corretamente mantidas num intervalo de ± 20 % em relação à média dos valores medidos;
- A mortalidade durante o período de exposição deve ser ≤ 20 % em cada replicado, no que diz respeito aos controlos;
- A viabilidade deve ser ≥ 70 % na desova escolhida para dar início ao estudo;
- O tempo mediano até à fase NF62 nos controlos deve ser ≤ 45 dias.
- O peso médio dos organismos de ensaio na fase NF62 e no fim do ensaio, no âmbito dos controlos e dos controlos com solvente (se utilizado), deve atingir, respetivamente, $1,0 \pm 0,2$ e $11,5 \pm 3$ g.

13. Embora não seja um critério de validade, recomenda-se que estejam disponíveis para análise, pelo menos, três níveis de tratamento, com três replicados não comprometidos. Uma mortalidade excessiva, que compromete um tratamento, é definida como a ocorrência de mais de quatro mortes (> 20 %) que não possam ser explicadas por um erro técnico em, pelo menos, dois replicados. A análise deve incluir, pelo menos, três níveis de tratamento isentos de toxicidade manifesta. Os sinais de toxicidade manifesta podem incluir, entre outros, a flutuação à superfície, a imobilização no fundo do viveiro, natação invertida ou irregular, falta de atividade à superfície e ausência de reação aos estímulos, anomalias morfológicas (por exemplo, deformidades nos membros), lesões hemorrágicas e edema abdominal.

14. Caso se observem desvios em relação aos critérios de validade do ensaio, devem ponderar-se as consequências no respeitante à fiabilidade dos resultados do ensaio, devendo esses desvios e a respetiva apreciação ser incluídos no relatório de ensaio.

DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Equipamento

15. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:

- a) Aparelhos de controlo da temperatura (por exemplo, aquecedores ou refrigeradores reguláveis a 21 ± 1 °C);
- b) Termómetro;
- c) Microscópio binocular de dissecação e ferramentas de dissecação;
- d) Máquina fotográfica digital com resolução mínima de 4 megapixels e função micro (se necessário);
- e) Balança analítica com precisão de 0,001 mg ou 1 µg;
- f) Medidor de oxigénio dissolvido e medidor de pH;
- g) Aparelho de medição da intensidade luminosa capaz de apresentar resultados em lux.

Água

Fonte e qualidade

16. Pode ser utilizada qualquer água de diluição disponível no local (por exemplo, água de nascente ou água da torneira filtrada com carvão) e permita o crescimento e desenvolvimento normais de *X. laevis*, devendo dispor-se de informações concretas que demonstrem o crescimento normal nesta água. Uma vez que a qualidade da água local pode diferir substancialmente de uma zona para outra, é necessário analisá-la, sobretudo no caso de não se dispor de dados históricos sobre a utilização da mesma na criação de larvas de anfíbios. Importa determinar o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , etc.), de pesticidas, de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão antes de iniciar o ensaio e/ou, por exemplo, de seis em seis meses, caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém relativamente constante. No apêndice 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

Concentração de iodeto na água utilizada no ensaio

17. Para que a glândula tiroide sintetize as hormonas que favorecem uma metamorfose normal, as larvas devem dispor de quantidades suficientes de iodeto proveniente de uma combinação de fontes aquosas e alimentares. Atualmente, não existem orientações empíricas quanto às concentrações mínimas de iodeto nos alimentos ou na água necessárias para garantir um desenvolvimento adequado. No entanto, a disponibilidade de iodetos pode afetar a capacidade de resposta do sistema tiróideo aos agentes ativos da tiroide e sabe-se que influencia a atividade basal da glândula tiroide, aspeto a ter em conta na interpretação dos resultados histopatológicos relativos à tiroide. Em trabalhos anteriores, demonstrou-se o bom desempenho do ensaio com concentrações de iodeto de água de diluição (I⁻) compreendidas entre 0,5 e 10 µg/l. Idealmente, a concentração de iodeto (adicionado sob a forma de sal de sódio ou de potássio) na água de diluição, durante todo o ensaio, deve ser de 0,5 µg/l. Se a água for obtida por reconstituição de água desionizada, é necessário adicionar iodo de modo a obter uma concentração deste não inferior a 0,5 µg/l. É necessário mencionar no relatório as concentrações de iodetos medidas na água utilizada no ensaio (a água de diluição), bem como a adição de iodo ou outros sais (se for o caso) àquela água. Além de ser medido na água, pode também medir-se o teor de iodo nos alimentos.

Sistema de exposição

18. O ensaio foi concebido utilizando um sistema de diluição com fluxo contínuo. Os componentes do sistema devem ser constituídos por um material adaptado ao contacto com a água, como o vidro, o aço inoxidável e/ou outros materiais quimicamente inertes. Os viveiros de exposição devem ser aquários de vidro ou de aço inoxidável com um volume útil compreendido entre 4,0 e 10,0 l (profundidade mínima da água de 10 a 15 cm). O sistema deve ser capaz de suportar todas as concentrações de exposição, um controlo e um controlo com solvente, se necessário, com quatro replicados por tratamento e oito replicados para os controlos. O caudal deve ser constante em cada viveiro, a fim de garantir a estabilidade das condições biológicas e da exposição química. Recomenda-se que os caudais sejam adequados (no mínimo, 5 renovações por dia) para evitar declínios da concentração do produto químico, devido ao metabolismo dos organismos de ensaio e dos microrganismos aquáticos presentes nos aquários ou nas vias abióticas de degradação (hidrólise, fotólise) ou de dissipação (volatilização, sorção). Os viveiros devem ser dispostos de forma aleatória no sistema de exposição, de modo a reduzir os possíveis efeitos decorrentes da posição, como ligeiras variações de temperatura, intensidade luminosa, etc. Para mais informações sobre a montagem de sistemas de exposição de fluxo contínuo, consultar o guia da ASTM intitulado *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Introdução dos produtos químicos: preparação das soluções de ensaio

19. Para preparar as soluções de ensaio no sistema de exposição, convém introduzir neste uma solução-mãe do produto químico em estudo, com o auxílio de uma bomba adequada ou outro aparelho. O débito da solução-mãe deve ser calibrado de acordo com a confirmação analítica das soluções de ensaio antes do início da exposição, e deve ser objeto de controlo volumétrico periódico durante o ensaio. A solução de ensaio de cada viveiro deve ser renovada a uma taxa de pelo menos 5 renovações em volume/dia.
20. O método utilizado para introduzir o produto químico em estudo no sistema varia em função das suas propriedades físico-químicas. Por conseguinte, antes do ensaio, devem obter-se informações de base sobre o produto que sejam relevantes para determinar a sua testabilidade. No que respeita às propriedades específicas do produto químico em estudo, são úteis as seguintes informações: fórmula estrutural, peso molecular, pureza, estabilidade na água e à luz, pK_a e coeficiente de partição octanol-água, solubilidade em água (de preferência no meio de ensaio) e pressão de vapor, bem como os resultados de um ensaio de biodegradabilidade fácil – método de ensaio C.4 (17) ou C.29 (18). A solubilidade na água e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante de Henry, que indica os riscos de perda do produto químico em estudo por evaporação. A realização do ensaio sem as informações acima enumeradas deve ser objeto de uma ponderação cuidadosa, uma vez que a conceção do estudo dependerá das propriedades físico-químicas do produto químico em causa e que, sem estes dados, os resultados do ensaio podem ser difíceis de interpretar ou desprovidos de sentido. Para determinar a concentração do produto nas soluções de ensaio, deve dispor-se de um método de análise fiável, com uma previsão e um limite de deteção conhecidos e notificados. Os produtos químicos em estudo solúveis em água podem ser dissolvidos em alíquotas de água de diluição a uma concentração que permita alcançar a concentração de ensaio-alvo num sistema de fluxo contínuo. Os produtos químicos líquidos ou sólidos à temperatura ambiente e moderadamente solúveis na água podem necessitar de saturadores líquido:líquido ou líquido:sólido (por exemplo, coluna de lã de vidro) (19). Embora também seja possível administrar produtos químicos muito hidrófobos através da alimentação, esta via de exposição foi pouco explorada no presente ensaio.
21. As soluções de ensaio são ajustadas à concentração pretendida por diluição de uma solução-mãe. De preferência, a solução-mãe deve ser preparada por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição, por meios mecânicos (agitação e/ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas/sistemas de saturação ou métodos de dosagem passiva (20) para obter uma solução-mãe com a concentração pretendida. São preferíveis os sistemas desprovidos de veículos; no entanto,

os diferentes produtos químicos em estudo devem possuir propriedades físico-químicas variadas, que irão provavelmente exigir abordagens diferentes para a preparação das soluções aquosas para exposição química. Devem ser envidados todos os esforços para evitar a utilização de solventes ou outros veículos, porque: 1) alguns solventes podem, por si mesmos, provocar toxicidade e/ou respostas indesejáveis ou inesperadas; 2) o ensaio de produtos químicos acima da sua solubilidade em água (passível de ocorrer frequentemente quando se utilizam solventes) pode resultar em determinações inexatas de concentrações efetivas; 3) a utilização de solventes pode resultar num grau significativo de formação de biofilmes decorrente da atividade microbiana, com possível impacto nas condições ambientais, bem como na capacidade de manter as concentrações de exposição; 4) na ausência de dados históricos que demonstrem que o solvente não influencia o resultado do estudo, a sua utilização exige um tratamento compatível com o bem-estar animal, uma vez que é necessário um número superior de animais para a realização do ensaio. Para os produtos químicos difíceis de ensaiar, é possível, em último recurso, utilizar um solvente – consultar o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade aquática de substâncias e misturas difíceis (21) para estabelecer o melhor método. A escolha do solvente será determinada pelas propriedades químicas do produto químico em estudo e pela existência de dados de controlos históricos sobre o solvente. Na ausência destes, é necessário determinar a pertinência do solvente antes da realização do estudo definitivo. Caso seja inevitável a utilização de um solvente e ocorra atividade microbiana (formação de biofilmes), recomenda-se o registo/a inclusão no relatório da presença de biofilme em cada cuba (pelo menos uma vez por semana) durante todo o ensaio. Idealmente, a concentração de solvente deve ser mantida constante no controlo com solvente e em todos os grupos de tratamento. Caso tal não suceda, deve-se utilizar no controlo com solvente a concentração mais elevada no tratamento de ensaio. Se o solvente for utilizado como veículo, as suas concentrações máximas não devem exceder 100 µl/l ou 100 mg/l (21), recomendando-se que se mantenha a concentração mais baixa possível (*por exemplo*, ≤20 µl/l), para evitar que o solvente influencie os parâmetros medidos (22).

Animais de ensaio

Espécie de ensaio

22. A espécie utilizada no ensaio é *X. laevis*, porque se trata de uma espécie: 1) criada por rotina em laboratórios de todo o mundo, 2) facilmente obtida no comércio; 3) cujo sexo genético pode ser determinado.

Cuidados e reprodução de adultos

23. Os métodos de cuidados e de reprodução adaptados a *X. laevis* são descritos num documento de orientação normalizada (23). As condições de alojamento e os cuidados a ter com *X. laevis* também são descritos por Read (24). Para induzir a reprodução, três a cinco pares de adultos machos e fêmeas recebem uma injeção intraperitoneal de gonadotropina coriônica humana (hCG). A dose injetada nas fêmeas e nos machos é de, aproximadamente, 800-1000 UI e 500-800 UI, respetivamente, de hCG dissolvida numa solução salina a 0,6-0,9 % (ou uma solução de Ringer isotónica salina aplicável aos anfíbios; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Os volumes injetados devem ser equivalentes a cerca de 10 µl/g de peso corporal (~1000 µl). Em seguida, mantêm-se os casais reprodutores induzidos em grandes viveiros, ao abrigo de perturbações e em condições estáticas, de modo a estimular o amplexo. Cada viveiro de reprodução deve estar equipado com um fundo falso composto por uma rede em aço inoxidável (por exemplo, aberturas de 1,25 cm), para que os ovos possam cair para o fundo. As rãs injetadas com hCG no final da tarde põem normalmente a maior parte dos seus ovos até ao meio da manhã seguinte. Após a libertação e a fecundação de uma quantidade suficiente de ovos, os adultos devem ser retirados dos viveiros de reprodução. Os ovos são, em seguida, recolhidos e os revestimentos gelatinosos são removidos por tratamento com L-cisteína (23). Prepara-se uma solução de L-cisteína a 2 % e o pH é ajustado para 8,1 com NaOH 1 M. Esta solução a 21 °C é adicionada a um erlenmeyer de 500 ml que contenha os ovos de uma única desova, agitada cuidadosamente durante um a dois minutos e depois bem enxaguada, 6 a 8 vezes, com água de cultura a 21 °C. Os ovos são depois transferidos para um cristalizador e a sua viabilidade é determinada, devendo ser > 70 %, com anomalias mínimas nos embriões que apresentem divisão celular.

CONCEÇÃO DO ENSAIO

Concentrações de ensaio

24. Recomenda-se a utilização de, no mínimo, quatro concentrações do produto químico em estudo e de controlos adequados (incluindo controlos com solvente, se necessário). Regra geral, recomenda-se a separação das concentrações por um fator de espaçamento não superior a 3,2.
25. Para efeitos do presente ensaio, devem utilizar-se, na medida do possível, os resultados dos estudos existentes sobre os anfíbios para determinar a concentração mais elevada de ensaio, a fim de evitar concentrações manifestamente tóxicas. Podem contribuir para a definição desta concentração informações provenientes, por exemplo, de relações estrutura-atividade quantitativas, de referências cruzadas e de dados de estudos sobre anfíbios, como o ensaio da metamorfose dos anfíbios, o método de ensaio C.38 (25) e o

Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus (23) e/ou ensaios em peixes, como os métodos de ensaio C.48, C.41 e C.49 (26) (27) (28). Antes da execução do LAGDA, pode realizar-se uma experiência de determinação do intervalo das concentrações. Recomenda-se começar esta experiência nas 24 horas que se seguem à fecundação e manter a exposição durante 7-14 dias (ou mais, se necessário), fixando as concentrações de ensaio de modo a que sejam espaçadas por um fator de 10. Os resultados da experiência de determinação do intervalo das concentrações devem servir para estabelecer a concentração de ensaio máxima no LAGDA. Note-se que, se for necessário utilizar um solvente, a respetiva pertinência (ou seja, a questão de saber se pode influenciar o resultado do estudo) pode ser avaliada no âmbito do estudo de determinação do intervalo de concentrações.

Replicados no âmbito dos grupos de tratamento e dos controlos

26. Deve usar-se um mínimo de quatro viveiros replicados por concentração de ensaio e um mínimo de oito replicados para os controlos (e para o controlo com solvente, se necessário), pelo que o número de replicados no controlo e o eventual controlo com solvente deve ser duas vezes superior ao número de replicados de cada grupo de tratamento, a fim de garantir uma representatividade estatística adequada). Cada replicado deve conter, no máximo, 20 animais. O número mínimo de animais tratados seria de 15 (5 para a subamostra na fase NF62 e 10 juvenis). No entanto, são adicionados animais suplementares a cada replicado, a fim de manter o número crítico de 15 em caso de mortalidade.

PROCEDIMENTO

Síntese do ensaio

27. O ensaio é iniciado com embriões recém-eclodidos (fase NF8-10) e continua até ao desenvolvimento dos juvenis. Os animais são examinados diariamente para detetar mortalidade e quaisquer sinais de comportamento anormal. Na fase NF62, é recolhida uma subamostra de larvas (até 5 animais por replicado) e são examinados vários parâmetros (quadro 1). Depois de todos os animais terem atingido a fase NF66, ou seja, a conclusão da metamorfose (ou após 70 dias a contar do início do ensaio, consoante o que ocorrer primeiro), é efetuada uma seleção aleatória – mas sem subamostragem –, a fim de reduzir o número de animais a 10 por tanque (ver ponto 43); os restantes animais continuam a ser expostos até 10 semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 no controlo. No final do ensaio (amostragem juvenil) são efetuadas medições complementares (quadro 1).

Condições de exposição

28. O apêndice 3 contém um resumo completo dos parâmetros de ensaio. Durante o período de exposição, deve medir-se diariamente o oxigênio dissolvido, a temperatura e o pH das soluções de ensaio. A condutividade, a alcalinidade e a dureza são medidas uma vez por mês. No que diz respeito à temperatura da água das soluções de ensaio, os diferenciais entre replicados e entre tratamentos (no espaço de um dia) não devem exceder 1,0 °C. Além disso, no que se refere ao pH das soluções de ensaio, os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5.
29. As cubas de exposição podem ser sifonadas diariamente para remover os alimentos não consumidos e os produtos residuais, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada das cubas. Convém procurar minimizar a tensão e o trauma dos animais, sobretudo durante as deslocações, a limpeza dos aquários e o manuseamento. Há que evitar situações e ações que possam gerar tensão, como ruídos fortes e/ou continuados, batimentos nos aquários ou vibrações nas cubas.

Duração da exposição ao produto químico em estudo

30. A exposição é iniciada com embriões recém-eclodidos (fase FN8-10) e prolonga-se até dez semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 (≤ 45 dias a contar do início do ensaio) no grupo de controlo. Regra geral, a duração do LAGDA é de 16 semanas (máximo de 17 semanas).

Início do ensaio

31. Os animais progenitores utilizados para o início do ensaio devem ter previamente demonstrado que produzem descendência que pode ser geneticamente sexuada (apêndice 5). Após a desova dos adultos, os embriões são recolhidos, tratados com cisteína para remover o revestimento gelatinoso e selecionados em função da sua viabilidade (23). O tratamento com cisteína permite que os embriões sejam manuseados durante a seleção sem que adiram às superfícies. Esta é efetuada com o auxílio de um microscópio de dissecação, utilizando um conta-gotas de tamanho adequado para eliminar os embriões não viáveis. É preferível utilizar para o ensaio uma única desova que assegure uma viabilidade superior a 70 %. Os embriões na fase NF8-10 são distribuídos aleatoriamente por cubas de tratamento com um volume adequado de água de diluição, até que cada cuba contenha 20 embriões. Importa manusear os embriões com cuidado durante esta transferência, a fim de minimizar a tensão associada à manipulação e de evitar causar-lhes alguma lesão. Noventa e seis horas após a fecundação, os girinos devem ter subido ao longo da coluna de água e começado a agarrar-se às paredes da cuba.

Regime alimentar

32. O regime e a frequência de alimentação evoluem em função das fases de desenvolvimento de *X. laevis* e representam um aspeto muito importante do protocolo LAGDA. O excesso de alimentação durante a fase larvar conduz geralmente ao aumento da incidência e da gravidade da escoliose (apêndice 8), devendo ser evitado. Em contrapartida, a alimentação insuficiente durante a fase larvar resulta em taxas de desenvolvimento altamente variáveis entre os controlos, o que pode comprometer a representatividade estatística ou provocar confusão nos resultados dos ensaios. O apêndice 4 apresenta o regime alimentar recomendado para as larvas e os juvenis de *X. laevis* em condições de ensaio com fluxo contínuo, embora sejam admissíveis alternativas, desde que os organismos de ensaio cresçam e se desenvolvam de forma satisfatória. É importante notar que, caso estejam a ser medidos os parâmetros específicos do sistema endócrino, os alimentos devem ser isentos de substâncias ativas neste sistema, como a farinha de soja.

Alimentação das larvas

33. O regime alimentar recomendado para as larvas consiste em alimento inicial para trutas, discos de *Spirulina* e flocos para peixe-dourado (*por exemplo*, flocos TetraFin[®], Tetra, Alemanha), misturados na água de cultura ou de diluição. Esta mistura é administrada três vezes por dia, nos dias úteis, e uma vez por dia, aos fins de semana. Os girinos são igualmente alimentados com náuplios de 24 horas de artémias vivas (*Artemia* spp.), duas vezes por dia, nos dias úteis, e uma vez por dia, aos fins de semana, a começar no dia 8 após a fecundação. A alimentação das larvas, que deve ser homogênea em cada cuba de ensaio, deve permitir o crescimento e o desenvolvimento adequados dos animais, a fim de assegurar a reprodutibilidade e a transferibilidade dos resultados do ensaio: 1) o tempo mediano até à fase NF62 nos controlos deve ser ≤ 45 dias; 2) recomenda-se um peso médio de $1,0 \pm 0,2$ g na fase NF62 nos controlos.

Alimentação dos juvenis

34. Uma vez concluída a metamorfose, o regime de alimentação é constituído por alimentos de primeira escolha para anfíbios, por exemplo Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, EUA) (apêndice 4). Para as jovens rãs (juvenis precoces), os granulados são triturados brevemente num moinho de café ou numa misturadora ou esmagados com almofariz e pilão, a fim de reduzir a sua dimensão. Quando os juvenis forem suficientemente grandes para consumir os granulados inteiros, deixa de ser necessário triturá-los ou esmagá-los. Os animais devem ser alimentados uma vez por dia. A alimentação dos juvenis deve permitir o crescimento e o desenvolvimento adequados dos organismos: recomenda-se um peso médio de $11,5 \pm 3$ g nos juvenis de controlo no final do ensaio.

Química analítica

35. Antes do início do ensaio, há que definir a estabilidade do produto químico em estudo (*por exemplo*, a solubilidade, a degradabilidade e a volatilidade) e todos os métodos analíticos necessários, *por exemplo* com base em informações ou conhecimentos existentes. Em caso de administração das doses através da água de diluição, recomenda-se a análise da concentração de ensaio de cada cuba replicada antes do início do ensaio, para verificar o desempenho do sistema. Durante o período de exposição, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos adequados, de preferência uma vez por semana em, pelo menos, um replicado para cada grupo de tratamento, mudando todas as semanas de replicado num mesmo grupo de tratamento. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. Todavia, se a concentração do produto químico testado em solução tiver sido corretamente mantida, durante todo o ensaio, num intervalo de $\pm 20\%$ em relação à concentração nominal, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos. Além disso, o coeficiente de variação (CV) das concentrações de ensaio medidas ao longo de todo o período de ensaio num tratamento deve ser mantido, no máximo, a 20% em cada concentração. Se as concentrações medidas não permanecerem no intervalo de 80-120% da concentração nominal (por exemplo, ao testar produtos químicos altamente biodegradáveis ou adsorventes), as concentrações com efeito devem ser determinadas e expressas em relação à média aritmética das concentrações dos ensaios de fluxo contínuo.
36. Os débitos da água de diluição e da solução-mãe devem ser verificados a intervalos adequados – por exemplo, três vezes por semana – durante o período de exposição. No caso de produtos químicos que não possam ser detetados em algumas ou todas as concentrações nominais (por exemplo, devido a degradação rápida ou adsorção nas cubas de ensaio, ou a uma acumulação significativa no organismo dos animais expostos), recomenda-se que a taxa de renovação da solução de ensaio em cada cuba seja adaptada de modo a manter as concentrações de ensaio tão constantes quanto possível.

Observações e parâmetros medidos

37. Os parâmetros avaliados durante a exposição correspondem aos indicadores de toxicidade, incluindo mortalidade, comportamento anormal, sinais clínicos de doença e/ou de toxicidade geral e determinantes do crescimento (comprimento e peso), bem como aos parâmetros patológicos que possam corresponder, quer à toxicidade geral, quer aos mecanismos de ação dos perturbadores endócrinos que agem em processos fisiológicos mediados por estrogénios, por androgénios ou pela tiroide. Além disso, a concentração plasmática de VTG pode ser medida, a título facultativo, no final do ensaio. Esta medição pode ser útil para interpretar os resultados do estudo no contexto dos mecanismos

endócrinos dos produtos químicos suspeitos de serem desreguladores endócrinos. Os parâmetros e o calendário das medições encontram-se resumidos no quadro 1.

Quadro 1: Síntese dos parâmetros do LAGDA

Parâmetros*	Diariamente	Amostragem intercalar (amostras larvares)	Fim do ensaio (amostras de juvenis)
Mortalidade e anomalias	X		
Tempo até à fase NF62		X	
Histo(pato)logia (glândula tiroide)		X	
Morfometria (aumento do peso e do comprimento)		X	X
Índice hepatossomático (IHS)			X
Rácios sexuais genéticos/fenotípicos			X
Histopatologia (gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado)			X
Vitelogenina (VTG) (facultativo)			X

* Todos os parâmetros são analisados em termos estatísticos.

Mortalidade e observações diárias

38. Todos os viveiros devem ser verificados diariamente para detetar animais mortos, devendo registar-se a mortalidade em cada viveiro. Os animais mortos devem ser retirados do viveiro logo que sejam detetados. Deve registar-se do seguinte modo a fase de desenvolvimento dos animais mortos: anterior à fase NF58 (antes da aparição dos membros anteriores), entre as fases NF58 e NF62, entre as fases NF63 e NF66 (entre a fase NF62 e a absorção total da cauda) e posterior à fase NF66 (pós-larvar). Taxas de mortalidade superiores a 20 % podem indicar condições de ensaio inadequadas ou efeitos manifestamente tóxicos do produto químico em estudo. Os animais tendem a ser mais sensíveis a episódios de mortalidade não induzida por produtos químicos durante os primeiros dias de desenvolvimento após a desova e durante o clímax metamórfico. Esta mortalidade pode ser visível a partir dos dados de controlo.
39. Além disso, deve registar-se qualquer comportamento anormal observado, bem como malformações visíveis (por exemplo, escoliose) ou lesões. As observações de escoliose devem ser contadas (determinação da incidência) e classificadas quanto à gravidade (por exemplo, não observada – NO, mínima – 1, moderada – 2, grave – 3; apêndice 8). Devem envidar-se esforços para limitar a prevalência de escoliose moderada e grave (inferior a

10 % nos controlos) ao longo de todo o estudo, embora uma maior prevalência de anomalias no controlo não constitua necessariamente um motivo para interromper o ensaio. O comportamento normal dos animais em fase larvar caracteriza-se pela suspensão na coluna de água com a cauda a um nível superior à cabeça, pelo batimento rítmico regular da barbatana caudal, por emergências periódicas, pelos movimentos dos opérculos e pela reação a estímulos. Constituem comportamentos anormais, por exemplo, a flutuação à superfície, a imobilização no fundo do viveiro, a natação invertida ou irregular, a falta de atividade à superfície e a ausência de reação aos estímulos. Para os animais pós-metamórficos, além dos comportamentos anormais acima referidos, devem registar-se diferenças notórias no consumo de alimentos entre os grupos tratados. Entre as lesões e malformações visíveis podem incluir-se anomalias morfológicas (por exemplo, deformações dos membros), lesões hemorrágicas, edema abdominal e infeções bacterianas ou fúngicas, entre outras. O surgimento de lesões na cabeça dos juvenis, logo atrás das narinas, pode indiciar níveis de humidade insuficientes. Estas determinações são de ordem qualitativa e são consideradas análogas aos sinais clínicos de doença/*stress*, sendo efetuadas em comparação com os animais de controlo. Uma taxa de ocorrência nos viveiros superior à dos controlos constitui prova de toxicidade manifesta.

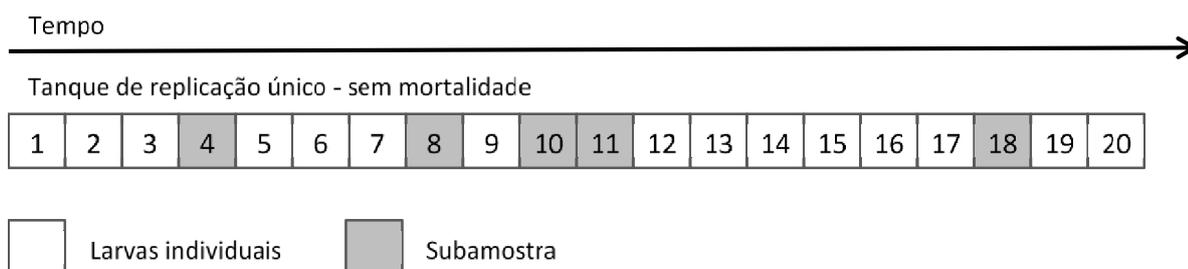
Subamostras de larvas

Descrição geral da preparação de subamostras de larvas:

40. Os girinos que tenham atingido a fase NF62 devem ser retirados dos viveiros e colhidos para amostragem ou transferidos para um novo viveiro para a parte seguinte da exposição, ou separados fisicamente dos restantes girinos no mesmo viveiro com um divisor. Os girinos são verificados diariamente, registando-se os dias do estudo em que cada girino atinge a fase NF62. A característica determinante no âmbito desta avaliação é a forma da cabeça. No momento em que o tamanho da cabeça diminui ao ponto de parecer ter sensivelmente a mesma largura que o tronco do girino e em que os membros anteriores atingem o nível do meio do coração, o indivíduo é registado como tendo atingido a fase NF62.
41. O objetivo é recolher amostras de um número total de cinco girinos na fase NF62 por cuba replicada. Este procedimento deve ser realizado de forma totalmente aleatória, mas decidida *a priori*. A **figura 1** apresenta um exemplo hipotético de uma cuba replicada. Caso existam 20 girinos sobreviventes num viveiro específico quando o primeiro indivíduo atinge a fase NF62, devem ser escolhidos ao acaso cinco números de 1 a 20. O girino n.º 1 é o primeiro indivíduo a atingir a fase NF62 e o girino n.º 20 é o último indivíduo do viveiro a atingir a fase NF62. Do mesmo modo, se houver 18 larvas sobreviventes num

viveiro, devem ser escolhidos cinco números ao acaso de 1 a 18. Segue-se o mesmo procedimento para cada cuba replicada assim que o primeiro indivíduo do ensaio atinge a fase NF62. Caso sejam detetados animais mortos durante a fase NF62 da amostragem, as restantes amostras têm de ser novamente selecionadas aleatoriamente, com base no número de larvas remanescentes abaixo da fase NF62 e no número de amostras adicionais necessárias para atingir um total de cinco amostras a partir desse replicado. No dia em que um girino atinge a fase NF62, consulta-se o diagrama de amostragem elaborado para determinar se o indivíduo em causa deve ser colhido para amostragem ou separado fisicamente dos restantes girinos para continuar a ser exposto. No exemplo apresentado (figura 1), o primeiro indivíduo a atingir a fase NF62 (caixa n.º 1) é separado fisicamente das outras larvas, continua a ser exposto e regista-se o dia do estudo em que tenha atingido a fase NF62. Subsequentemente, os indivíduos n.º 2 e n.º 3 são tratados da mesma forma que o n.º 1; em seguida, o indivíduo n.º 4 é colhido para amostra, para observação do crescimento e histologia da tiroide (neste exemplo). Este procedimento continua até que o 20.º indivíduo se junte aos restantes indivíduos que passaram a fase NF62 ou seja incluído na amostra. O procedimento aleatório utilizado deve permitir que cada indivíduo tenha a mesma probabilidade de ser selecionado. Para isso, é válido qualquer método de escolha aleatória, embora seja necessário garantir que todos os girinos são contabilizados a um dado momento durante o período de subamostragem, antes de alcançarem a fase NF62.

Figura 1: Exemplo hipotético do regime de amostragem na fase NF62 para uma única cuba replicada.



42. No caso da subamostragem das larvas, os parâmetros obtidos são os seguintes: 1) tempo decorrido até à fase NF62 (número de dias entre a fecundação e a fase NF62); 2) anomalias externas; 3) morfometria (por exemplo, peso e comprimento); 4) histologia da tiroide.

Eutanásia dos girinos

43. A subamostra de girinos na fase NF62 (cinco indivíduos por replicado) deve ser eutanasiada por imersão, durante 30 minutos, em quantidades adequadas (por exemplo,

500 ml) de solução anestésica (por exemplo, solução a 0,3 % de MS-222, metanossulfonato de triclaína, n.º CAS 886-86-2). A solução de MS-222 deve ser tamponada com bicarbonato de sódio até atingir um pH de cerca de 7,0, uma vez que uma solução MS-222 não tamponada é ácida e irritante para a pele da rã, resultando numa absorção deficiente e em tensão adicional desnecessária para os animais.

44. Os girinos são retirados da cuba experimental utilizando um enxalavar e transportados para a solução de eutanásia, onde são colocados. O animal é devidamente eutanasiado, estando preparado para a autópsia quando deixa de responder a estímulos externos como o beliscar do membro posterior com um par de fórceps.

Morfometria (peso e comprimento)

45. As medições do peso húmido (arredondada para o mg mais próximo) e do comprimento do focinho à cloaca (CFC) (arredondada para o 0,1 mm mais próximo) de cada girino devem ser efetuadas imediatamente depois de deixar de responder aos estímulos sob o efeito da anestesia (figura 2a). Pode utilizar-se *software* de análise de imagem para medir o CFC a partir de uma fotografia. Os girinos devem ser secados por tamponagem antes de serem pesados, de modo a remover o excesso de água aderente. Após as medições da dimensão corporal (peso e CFC), devem registar-se ou anotar-se quaisquer anomalias morfológicas visíveis e/ou sinais clínicos de toxicidade, tais como escoliose (ver apêndice 8), petéquias e hemorragia, sendo recomendável a utilização de documentação digital. De notar que as petéquias são pequenas hemorragias de cor vermelha ou púrpura nos capilares subcutâneos.

Colheita e fixação de tecidos

46. As glândulas tiroides da subamostra de larvas são submetidas a uma avaliação histológica. A parte inferior do tronco posterior aos membros anteriores é removida e rejeitada. A carcaça cortada é fixada em fixador de Davidson. O volume de fixador no recipiente deve ser, no mínimo, 10 vezes o volume aproximado dos tecidos. O fixador deve ser agitado ou circulado de forma adequada, para fixar corretamente os tecidos a analisar. Todos os tecidos permanecem no fixador de Davidson durante, pelo menos, 48 horas, mas não mais de 96 horas, altura em que são enxaguados com água desionizada e armazenados em formol neutro tamponado a 10 % (1) (29).

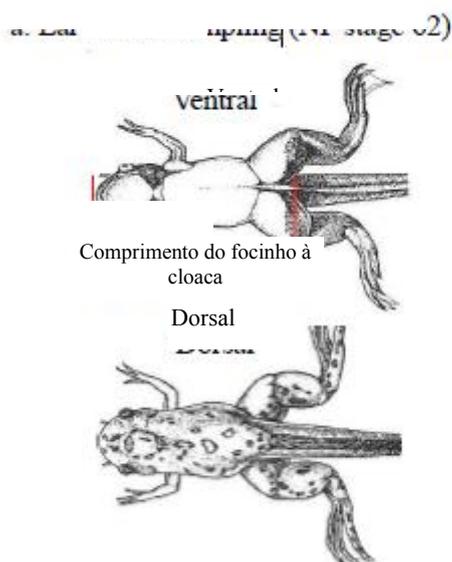
Histologia da tiroide

47. Cada subamostra de larvas (tecidos fixados) é submetida a uma avaliação histológica da glândula tiroide, nomeadamente diagnóstico e classificação da gravidade (29) (30).

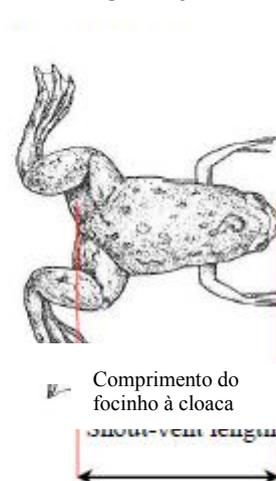
Figura 2: Referências para a medição do comprimento do focinho à cloaca para o LAGDA nas rãs em fase

NF62 (a) e juvenis (b). Características que definem a fase NF62 (a): a cabeça tem a mesma largura que o tronco, o comprimento do nervo olfativo é inferior ao diâmetro do bulbo olfativo (vista dorsal) e os membros anteriores estão ao nível do coração (vista ventral). Imagens adaptadas de Nieuwkoop e Faber (1994).

a. Subamostragem de larvas (NF etapa 62)



b. Amostragem de juvenis



Fim da exposição larvar

48. Tendo em conta o número inicial de girinos, é provável que uma pequena percentagem de indivíduos não se desenvolva normalmente e não complete a metamorfose (fase NF66) num período razoável. A parte larvar da exposição não deve exceder 70 dias. Os girinos restantes no final deste período devem ser eutanasiados (ver ponto 43), o seu peso húmido e CFC medidos, a sua fase de desenvolvimento determinada segundo Nieuwkoop e Faber (1994) e quaisquer anomalias de desenvolvimento anotadas.

Seleção após a fase NF66

49. Devem permanecer dez indivíduos por viveiro a partir da fase NF66 (reabsorção completa da cauda), até ao final da exposição. Por conseguinte, há que efetuar uma seleção após todos os animais terem atingido a fase NF66 ou após 70 dias (consoante o que ocorrer primeiro). Os animais que tenham atingido a fase NF66 mas que não serão expostos até ao final da exposição devem ser selecionados aleatoriamente.

50. Os animais não selecionados para serem conservados até ao fim da exposição são eutanasiados (ver ponto 43). Determina-se a fase de desenvolvimento, o peso húmido e o CFC (figura 2b) e é efetuada uma autópsia macroscópica de cada animal. Regista-se o sexo fenotípico (com base na morfologia das gónadas) – feminino, masculino ou indeterminado.

Amostras de juvenis

Descrição geral da preparação de amostras de juvenis

51. Os restantes animais continuam a ser expostos até 10 semanas após o tempo médio que decorre até à fase NF62 no controlo com água de diluição (e/ou no controlo com solvente, se for caso disso). No final do período de exposição, os restantes animais (no máximo, 10 rãs por replicado) são eutanasiados e os vários parâmetros medidos, ou avaliados, e registados: 1) morfometria (peso e comprimento); 2) rácios sexuais fenotípicos/genotípicos; 3) peso hepático (índice hepatossomático); 4) histopatologia (gónadas, ductos reprodutores, fígado e rins); a título facultativo, 5) VTG plasmática.

Eutanásia das rãs

52. As amostras de juvenis (rãs pós-metamórficas) são eutanasiadas por injeção intraperitoneal de um anestésico, como, por exemplo, MS-222 a 10 % numa solução-tampão de fosfatos adequada. As rãs podem ser incluídas na amostra depois de deixarem de responder a estímulos (em geral cerca de 2 minutos após a injeção, se for utilizado MS-222 a 10 % numa dosagem de 0,01 ml por g de rã). Embora as rãs juvenis possam ser imersas num anestésico mais concentrado (MS-222), a experiência demonstrou que uma anestesia segundo este método é mais demorada e que esta duração poderá não ser adequada para a amostragem. A injeção permite uma eutanásia rápida e eficiente antes da amostragem. A amostragem não deve ser iniciada antes de se confirmar a ausência de resposta das rãs a estímulos, para garantir que os animais estão mortos. Se as rãs apresentarem sinais de sofrimento considerável (muito graves, com morte previsível) e se considerar estarem moribundas, devem ser anestesiadas e eutanasiadas, sendo incluídas no parâmetro «mortalidade» para efeitos de análise de dados. Quando uma rã é eutanasiada devido a morbilidade, este facto deve ser registado e notificado. Consoante o momento do estudo em que a rã é eutanasiada, pode ser conservada e fixada para análise histopatológica.

Morfometria (peso e comprimento)

53. As medições do peso húmido e do CFC (figura 2b) são idênticas às descritas para as subamostras de larvas.

VTG plasmática (opção)

54. A VTG é um biomarcador amplamente aceite, resultante da exposição a produtos químicos estrogénicos. No que respeita ao LAGDA, a VTG plasmática pode, a título facultativo, ser medida em amostras de juvenis, o que pode ser particularmente útil se se suspeitar que o produto químico em estudo é um estrogénio.
55. Os membros posteriores dos juvenis eutanasiados são cortados e o sangue recolhido com um tubo capilar heparinizado (embora possam revelar-se adequados métodos alternativos de colheita de sangue, como a punção cardíaca). O sangue é expelido para um tubo de microcentrífuga (por exemplo, de 1,5 ml) e centrifugado para obter plasma. As amostras de plasma devem ser armazenadas a uma temperatura igual ou inferior a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à determinação da VTG. A concentração de VTG plasmática pode ser determinada por um ensaio de imunoabsorção enzimática (método ELISA – apêndice 6) ou por um método alternativo, como a espectrometria de massa (31). É preferível utilizar anticorpos específicos da espécie, devido à sua maior sensibilidade.

Determinação do sexo genético

56. O sexo genético de cada rã juvenil é avaliado com base nos marcadores desenvolvidos por Yoshimoto *et al.* (11). Para determinar o sexo genético, uma parte (ou a totalidade) de um membro posterior – ou de qualquer outro tecido – removido durante a dissecação é recolhida e armazenada num tubo de microcentrífuga; podem obter-se amostras de tecido de rãs a partir de qualquer tecido. Os tecidos podem ser armazenados a uma temperatura igual ou inferior a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ao isolamento do ácido desoxirribonucleico (ADN). O isolamento do ADN a partir dos tecidos pode ser efetuado com *kits* disponíveis no mercado e a análise da presença ou ausência do marcador é efetuada por um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) (apêndice 5). Regra geral, a concordância entre o sexo histológico e o genótipo dos animais de controlo no momento da amostragem dos juvenis nos grupos de controlo é superior a 95 %.

Colheita e fixação de tecidos para histopatologia

57. As gónadas, os ductos reprodutores, os rins e os fígados são colhidos para análise histológica durante a amostragem final. A cavidade abdominal é aberta e o fígado é dissecado e pesado. Em seguida, os órgãos digestivos (estômago, intestinos, etc.) são cuidadosamente retirados do abdómen inferior para revelar as gónadas, os rins e os ductos reprodutores. Devem anotar-se quaisquer anomalias morfológicas visíveis nas gónadas. Por último, os membros posteriores devem ser removidos se não tiverem sido previamente retirados para colheita de sangue. Os fígados colhidos e a carcaça com as gónadas deixadas *in situ* devem ser imediatamente colocados em fixador de Davidson. O volume de fixador no recipiente deve ser, no mínimo, 10 vezes o volume aproximado dos tecidos. Todos os

tecidos permanecem no fixador de Davidson durante, pelo menos, 48 horas, mas não mais de 96 horas, altura em que são enxaguados com água desionizada e armazenados em formol neutro tamponado a 10 % (1) (29).

Histopatologia

58. Cada amostra de juvenis é submetida a uma análise histológica para detetar uma eventual patologia nas gónadas, nos ductos reprodutores, nos rins e nos tecidos hepáticos, para diagnóstico e classificação de gravidade (32). O fenótipo gonadal (ovários, testículos, intersexual) decorre também desta avaliação. Juntamente com as medições do sexo genético de cada indivíduo, estas observações podem ser utilizadas para calcular os rácios sexuais fenotípicos/genotípicos.

COMUNICAÇÃO DE DADOS

Análise estatística

59. O LAGDA gera três tipos de dados a analisar estatisticamente: 1) dados quantitativos contínuos (peso, CFC, IHS, VTG); 2) dados relativos ao tempo até ao evento, no que se refere às taxas de desenvolvimento (número de dias desde o início do ensaio até à fase NF62); 3) dados ordinais sob a forma de índices de gravidade ou fases de desenvolvimento a partir de avaliações histopatológicas.

60. Recomenda-se que a conceção do ensaio e a seleção dos testes estatísticos assegurem a representatividade necessária para detetar alterações de importância biológica nos parâmetros, sempre que se deva comunicar uma NOEC ou CEx. É preferível efetuar estas análises estatísticas (em geral, com base na média dos replicados) segundo os procedimentos descritos no documento da OCDE sobre os métodos atuais de análise estatística dos dados de ecotoxicidade (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (33). O apêndice 7 apresenta a árvore de decisão recomendada para a análise estatística e fornece orientações para o tratamento dos dados e para a escolha do teste, ou modelo estatístico, mais adequado a utilizar no LAGDA.

61. Os dados das amostras de juvenis (crescimento, IHS, etc.) devem ser analisados separadamente para cada sexo genotípico, uma vez que este é determinado para todas as rãs.

Considerações relativas à análise dos dados

Utilização de replicados e de tratamentos comprometidos

62. Os replicados e os tratamentos podem ser comprometidos devido a uma mortalidade excessiva resultante de toxicidade manifesta, doença ou erro técnico. Se um tratamento for comprometido devido a doença ou erro técnico, devem estar disponíveis para análise três tratamentos não comprometidos e três replicados não comprometidos. Se ocorrer toxicidade manifesta no(s) tratamento(s) com doses elevadas, é preferível que estejam disponíveis para análise, pelo menos, três níveis de tratamento com três replicados não comprometidos – de acordo com a abordagem da concentração máxima tolerada nas orientações de ensaio da OCDE (34). Além da mortalidade, os sinais de toxicidade manifesta podem incluir efeitos comportamentais (por exemplo, flutuação à superfície, imobilização no fundo do viveiro, natação invertida ou irregular, falta de atividade à superfície), lesões morfológicas (por exemplo, lesões hemorrágicas, edema abdominal) ou inibição de reações normais ao regime alimentar quando em comparação com os animais de controlo, de um ponto de vista qualitativo.

Controlo com solvente

63. No final do ensaio, deve efetuar-se uma avaliação dos efeitos potenciais do solvente (se tiver sido utilizado). Para isso, efetua-se uma comparação estatística dos resultados do grupo de controlo com solvente com os do grupo de controlo com água de diluição. Os parâmetros mais relevantes a considerar nesta análise são os fatores que determinam o crescimento (peso e comprimento), já que podem ser afetados em caso de toxicidade generalizada. Se forem detetadas diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros entre o grupo de controlo com água de diluição e o grupo de controlo com solvente, deve recorrer-se ao parecer de um perito para determinar se a validade do ensaio foi comprometida. Se os dois controlos diferirem, os grupos expostos ao produto químico devem ser comparados com o controlo com solvente, a menos que se saiba que é preferível compará-los com o controlo com água de diluição. Caso não haja diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de controlo, recomenda-se que os grupos expostos ao produto químico em estudo sejam comparados com os dois grupos de controlo em conjunto (controlo com solvente e controlo com água de diluição), exceto se se souber que é preferível compará-los, quer com o grupo de controlo com água de diluição, quer com o grupo de controlo com solvente.

Relatório de ensaio

64. O relatório de ensaio deve incluir os seguintes elementos:

Produto químico em estudo:

- Natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes;

- Substância monocomponente:
 - aspeto físico, solubilidade na água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;
 - identificação química, como o nome IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, a pureza, a identidade química das impurezas, se necessário e exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for caso disso).
- Substância multicomponentes, UVCB e misturas:
 - caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Espécie utilizada no ensaio:

- Nome científico, estirpe, se disponível, origem e método de colheita dos ovos fecundados e posterior manuseamento;
- Incidência de escoliose em controlos históricos no que diz respeito à cultura-mãe utilizada.

Condições de ensaio:

- Fotoperíodo(s);
- Conceção do ensaio (por exemplo, dimensões da câmara, volume de água e material, número de câmaras de ensaio e replicados, número de organismos de ensaio por replicado);
- Método de preparação das soluções-mãe e frequência da renovação (se for utilizado um agente solubilizante, deve indicar-se a sua concentração);
- Método de dosagem do produto químico em estudo (por exemplo, bombas, sistemas de diluição);
- Eficiência de recuperação do método e valores nominais das concentrações de ensaio, limite de quantificação, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e respetivos desvios-padrão; método de obtenção desses desvios e médias, bem como elementos comprovativos de que as medições correspondem às concentrações do produto químico em estudo perfeitamente dissolvido;
- Características da água de diluição: pH, dureza, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), iodo total, carbono orgânico total (idem), sólidos em suspensão (idem), salinidade do meio de ensaio (idem) e quaisquer outras medições efetuadas;

- Valores nominais das concentrações de ensaio, médias dos valores medidos e respetivos desvios-padrão;
- Qualidade da água nos recipientes de ensaio, pH, temperatura (diariamente) e concentração de oxigénio dissolvido;
- Informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo, tipo de alimentos, origem, quantidade distribuída e frequência).

Resultados:

- Provas de que os controlos cumpriram os critérios de validade;
 - Dados relativos ao grupo de controlo (mais o controlo com solvente, se este tiver sido utilizado) e aos grupos tratados: mortalidade e anomalias observadas, tempo decorrido até à fase NF62, avaliação da histologia da tiroide (apenas amostra de larvas), crescimento (peso e comprimento), IHS (apenas amostra de juvenis), rácios sexuais genéticos/fenotípicos (apenas amostra de juvenis), resultados da avaliação histopatológica das gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado (apenas amostra de juvenis) e VTG plasmática (apenas amostra de juvenis, se efetuada);
 - Abordagem para a análise estatística e tratamento de dados (teste ou modelo estatístico utilizado);
 - Concentração sem efeitos observáveis (NOEC) para cada resposta avaliada;
 - Concentração mínima com efeito observável (LOEC) para cada resposta avaliada (a $\alpha=0,05$); CEx para cada resposta avaliada, se aplicável, e intervalos de confiança (95 %, por exemplo); gráfico do modelo ajustado utilizado para a calcular a CEx, declive da curva concentração-resposta, fórmula do modelo de regressão e estimativa dos parâmetros do modelo e dos respetivos erros-padrão.
 - Qualquer desvio em relação ao presente método de ensaio e aos critérios de aceitação, bem como considerações relativas ao eventual seguimento a dar aos resultados do ensaio.
65. No que diz respeito aos resultados das medições dos parâmetros, devem apresentar-se os valores médios e os respetivos desvios-padrão (por replicado e por concentração, se possível).
66. Deve calcular-se o tempo médio decorrido até à fase NF62 nos controlos, apresentado como a média das medianas nos replicados e o seu desvio-padrão. Do mesmo modo, para os tratamentos, deve calcular-se uma mediana, apresentada como a média das medianas nos replicados e o seu desvio-padrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, Nova Iorque, NY, EUA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Filadélfia, PA, EUA.
- (17) Capítulo C.4 do presente anexo: Ensaio de biodegradabilidade fácil.
- (18) Capítulo C.29 do presente anexo: Biodegradabilidade fácil — CO₂ em recipientes estanques (ensaio pela técnica de «headspace»).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593-9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Filadélfia, PA, EUA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Capítulo C.38 do presente anexo, Ensaio da Metamorfose dos Anfíbios.
- (26) Capítulo C.48 do presente anexo, Ensaio de reprodução a curto prazo em peixes.
- (27) Capítulo C.41 do presente anexo, Ensaio de desenvolvimento sexual em peixes.
- (28) Capítulo C.49 do presente anexo, Ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology* 91(3): 197-202.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Parâmetro apical: Provoca efeitos ao nível da população.

Produto químico: Substância ou mistura.

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática.

CE_x: (Concentração efetiva com x % de efeito): concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente a um grupo de controlo. Por exemplo, a CE₅₀ é a concentração estimada que produz efeitos num parâmetro do ensaio em 50 % de uma população exposta durante um determinado período de exposição.

d_{pf}: Dias pós-fecundação.

Ensaio de fluxo contínuo: Um ensaio com fluxo contínuo de soluções de ensaio através do sistema de ensaio durante o período de exposição.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Concentração mínima com efeito observável (LOEC): A menor concentração de ensaio de um produto químico em estudo para a qual se observa um efeito significativo (a $p < 0,05$), comparativamente com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior aos observados com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, conseqüentemente, a NOEC). O apêndice 7 fornece orientações nesta matéria.

Concentração letal média (CL₅₀): Concentração de um produto químico em estudo que se estima ser letal para 50 % dos organismos sujeitos ao ensaio durante o ensaio.

Concentração sem efeito observável (NOEC): Concentração de ensaio imediatamente abaixo da LOEC que, comparativamente ao grupo de controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), durante um determinado período de exposição.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification.*

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

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

VTG: Vitelogenina. É uma fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo, que ocorre normalmente nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

Apêndice 2**ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL**

Substância	Concentração limite
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados totais e dos bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsénico	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

Apêndice 3**CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA O LAGDA**

1. Espécie de ensaio	<i>Xenopus laevis</i>
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	A temperatura nominal é de 21 °C. A temperatura média durante o ensaio é de 21 ± 1 °C (os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 1 °C).
4. Qualidade da iluminação	Lâmpadas fluorescentes (largo espectro) 600-2000 lux (lúmenes/m ²) à superfície da água
5. Fotoperíodo	12 h de luz/12 h de escuridão
6. Volume da solução de ensaio e recipiente de ensaio (cuba)	4-10 l (profundidade mínima da água de 10–15 cm) Cuba de vidro ou de aço inoxidável
7. Renovação da solução de ensaio, em volume	Constante, a fim de garantir a estabilidade das condições biológicas e da exposição química (por exemplo, cinco renovações do volume do viveiro por dia)
8. Idade dos organismos de ensaio no início	Fase 8-10 segundo Nieuwkoop e Faber (NF)
9. Número de organismos por replicado	20 animais (embriões)/cuba (replicado) no início da exposição e 10 animais (juvenis)/cuba (replicado) após a fase NF66 e até ao fim da exposição
10. Número de tratamentos	No mínimo, 4 tratamentos com o produto químico em estudo e controlo(s) adequado(s).
11. Número de replicados por tratamento	4 replicados por tratamento com o produto químico em estudo e 8 replicados para o(s) controlo(s)
12. Número de organismos por concentração de ensaio	No mínimo 80 animais por tratamento com o produto químico em estudo e no mínimo 160 replicados para o(s) controlo(s)
13. Água de diluição	Qualquer água que permita o crescimento e desenvolvimento normais de <i>X. laevis</i> (por exemplo, água de nascente ou água da torneira filtrada com carvão)
14. Arejamento	Não é necessária, mas o arejamento das cubas pode ser necessário se os níveis de oxigénio dissolvido descenderem abaixo dos limites

recomendados e se o fluxo da solução de ensaio for maximizado.

15. Oxigénio dissolvido da solução de ensaio $\geq 40\%$ do valor da saturação no ar ou $\geq 3,5$ mg/l
16. pH da solução de ensaio 6,5-8,5 (os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5)
17. Dureza e alcalinidade da solução de ensaio 10-250 mg CaCO₃/l
18. Regime alimentar (Ver apêndice 4)
19. Período de exposição Da fase NF8-10 a dez semanas após o tempo mediado até à fase NF62 no grupo de controlo com água de diluição e/ou solvente (máximo 17 semanas)
20. Parâmetros biológicos Mortalidade (e anomalias observadas), tempo até à fase NF62 (amostra de larvas), avaliação da histologia da tiroide (amostra de larvas), crescimento (peso e comprimento), índice hepatossomático (amostra de juvenis), rácios sexuais genéticos/fenotípicos (amostra de juvenis), histopatologia das gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado (amostra de juvenis) e vitelogenina plasmática (amostra de juvenis, facultativa).
21. Critérios de validade do ensaio O oxigénio dissolvido deve ser $> 40\%$ do valor da saturação no ar; A temperatura média da água deve ser de 21 ± 1 °C e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos devem ser $< 1,0$ °C; O pH da solução de ensaio deve variar entre 6,5 e 8,5; A mortalidade no controlo deve ser $\leq 20\%$ em cada replicado e o tempo médio até à fase NF62 no controlo deve ser ≤ 45 dias; o peso médio dos organismos de ensaio na fase NF62 e no fim do ensaio no âmbito dos controlos e dos controlos com solvente (se utilizado) deve atingir, respetivamente, $1,0 \pm 0,2$ e $11,5 \pm 3$ g; os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo em solução foram corretamente mantidas num intervalo de $\pm 20\%$ em relação à média dos valores medidos.

Apêndice 4

REGIME ALIMENTAR

Note-se que, embora este regime alimentar seja recomendado, são admissíveis alternativas, desde que os organismos de ensaio cresçam e se desenvolvam a um ritmo adequado.

Alimentação das larvas

Preparação dos alimentos a administrar às larvas

- A. 1:1 (v/v) alimento inicial para trutas: algas/TetraFin® (ou equivalente);
1. Alimento inicial para trutas: misturar 50 g de alimento inicial para trutas (grânulos finos ou pó) e 300 ml de água filtrada adequada num misturador a alta velocidade, durante 20 segundos
 2. Mistura de algas/TetraFin® (ou equivalente): misturar 12 g de discos de espirulina com 500 ml de água filtrada num misturador a alta velocidade durante 40 segundos, misturar 12 g de Tetrafin® (ou equivalente) com 500 ml de água filtrada e, em seguida, combinar tudo a fim de obter 1 l de 12 g/l de espirulina e 12 g/l de Tetrafin® (ou equivalente)
 3. Combinar volumes iguais da mistura de alimento inicial para trutas e da mistura de algas/TetraFin® (ou equivalente)
- B. Artémias:

Fazer eclodir 15 ml de ovos de artémias em 1 l de água salgada (preparada acrescentando 20 ml de NaCl a 1 l de água desionizada). Após o arejamento durante 24 horas à temperatura ambiente, sob luz constante, colhem-se as artémias. O fim do arejamento permite que as artémias se depositem durante 30 minutos. Os quistos que flutuem à superfície do coletor são retirados e eliminados e as artémias filtradas de forma adequada e mergulhadas em 30 ml de água filtrada.

Protocolo alimentar

O quadro 1 ilustra o tipo e a quantidade de alimentos administrados às larvas durante toda a exposição. Os animais devem ser alimentados três vezes por dia, de segunda a sexta-feira, e uma vez por dia aos fins de semana.

Quadro 1: Regime alimentar das larvas de *X. laevis* em condições de fluxo contínuo

Tempo* (pós-fecundação)	Alimento inicial para trutas: algas/TetraFin® (ou equivalente)		Artémias	
	Semana (3 vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)	Semana (duas vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)

Dias 4-14 (semanas 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (do dia 8 ao 15)	0,5 ml (do dia 8 ao 15)
Semana 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (a partir do dia 16)	1 ml (a partir do dia 16)
Semana 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Semana 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Semana 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Semana 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Semana 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Semanas 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* O dia 0 é definido como o dia da injeção de hCG.

Transição alimentar da fase larvar para a fase juvenil

Assim que completam a metamorfose, as larvas transitam para a fórmula alimentar destinada aos juvenis, que a seguir se especifica. Durante a transição, o regime alimentar das larvas deve ser reduzido à medida que o regime alimentar dos juvenis aumenta. Tal pode ser feito reduzindo as rações administradas às larvas na proporção do aumento das administradas aos juvenis em cada grupo de cinco girinos que ultrapasse a fase NF62 e se aproxime da conclusão da metamorfose na fase NF66.

Alimentação dos juvenis

Regime alimentar dos juvenis

Uma vez concluída a metamorfose (fase 66), o regime alimentar passa para alimentos de primeira escolha para anfíbios de 3/32 polegadas em exclusivo (Xenopus ExpressTM, FL, EUA), ou equivalente.

Preparação de grânulos esmagados para a transição da fase larvar para a fase juvenil

Os granulados são triturados brevemente num moinho de café ou numa misturadora, ou esmagados com almofariz e pilão a fim de reduzir a sua dimensão em aproximadamente 1/3. O processamento excessivo produz pó, sendo, por isso, desaconselhado.

Protocolo alimentar

O **quadro 2** ilustra o tipo e a quantidade de alimentos administrados aos juvenis e aos adultos. Os animais devem ser alimentados uma vez por dia. Note-se que, após a metamorfose, os animais continuam a receber uma porção de artémias até mais de 95 % dos

animais completarem a metamorfose.

Os animais não devem ser alimentados no dia da conclusão do ensaio, para que a alimentação não interfira na pesagem.

Quadro 2: Regime alimentar de juvenis de *X. laevis* em condições de fluxo contínuo. Note-se que os animais não metamorfoseados, incluindo aqueles cuja metamorfose foi atrasada pelo tratamento com o produto químico, não podem comer grânulos não esmagados.

Tempo (semanas após a data mediana de metamorfose)	Volume de grânulos esmagados (mg por jovem rã)	Volume total de grânulos (mg por jovem rã)
Aquando da metamorfose dos animais	25	0
Semanas 0-1	25	28
Semanas 2-3	0	110
Semanas 4-5	0	165
Semanas 6-9	0	220

* O primeiro dia da Semana 0 é a data mediana de metamorfose nos animais de controlo.

Apêndice 5

DETERMINAÇÃO DO SEXO GENÉTICO (SEXAGEM GENÉTICA)

O método de sexagem genética de *Xenopus laevis* baseia-se em Yosshimoto *et al.* (2008). Podem obter-se os procedimentos de genotipagem detalhados consultando esta publicação. É possível utilizar métodos alternativos (por exemplo, PCR quantitativa de alto débito), se isso for considerado adequado.

Iniciadores de *X. laevis*

Marcador DM-W

Senso: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Contra-senso: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Controlo positivo

Senso: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Contra-senso: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificação do ADN

Purificar o ADN extraído de tecidos musculares ou cutâneos utilizando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69506) – ou um produto similar –, de acordo com as respetivas instruções. O ADN pode ser eluído das colunas de centrifugação utilizando menos tampão para obter amostras mais concentradas, se tal for considerado necessário para a PCR. De notar que o ADN é bastante estável; convém, pois, ter cuidado para evitar contaminações cruzadas que possam conduzir a erros na caracterização dos machos como fêmeas, ou vice-versa.

PCR

O **quadro 1** apresenta um exemplo de protocolo utilizando JumpStart™ *Taq* da Sigma.

Quadro 1: Exemplo de protocolo utilizando JumpStart™ *Taq* da Sigma

Mistura principal	1x (µl)	[Final]
--------------------------	----------------	----------------

Água isenta de nuclease	11	-
Tampão 10X	2,0	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (10mM cada)	0,4	200 µM
Marcador para iniciador senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marcador para iniciador contra-senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controlo para iniciador senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controlo para iniciador contra-senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unidades/µl
Matriz de ADN	1,0	~200 pg/µl

Nota: Ao preparar a mistura principal, preparar uma quantidade superior à desejada para compensar eventuais perdas que possam ocorrer durante a pipetagem (exemplo: utilizar 25x para apenas 24 reações).

Reação:

Mistura principal	19,0 µl
Matriz	1,0 µl
Total	<u>20,0 µl</u>

Perfil do termociclador:

Passo 1.	94 °C (1 min)
Passo 2.	94 °C (30 seg)
Passo 3.	60 °C (30 seg)
Passo 4.	72 °C (1 min)
Passo 5.	Ir para o passo 2 (35 ciclos)
Passo 6.	72 °C (1 min)
Passo 7.	4 °C (manter)

Os produtos PCR podem ser colocados imediatamente num gel ou conservados a 4 °C.

Eletroforese em gel de agarose (3 %) (protocolo de amostragem)

TAE 50X

Tris 24,2 g
Ácido acético glacial 5,71 ml
Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
Adicionar água até perfazer 100 ml

TAE 1X

H₂O 392 ml
TAE 50X 8 ml

3:1 Agarose

3 partes de agarose NuSieve™ GTG™
1 parte de agarose Fisher de baixa eletroendosmose (EEO)

Método

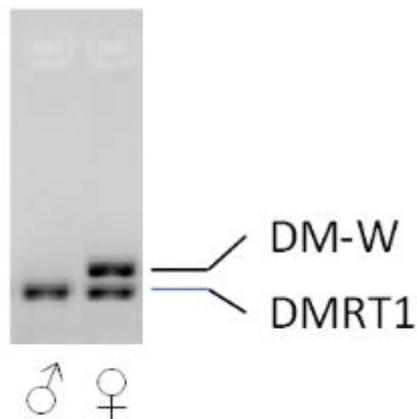
1. Preparar um gel a 3 % acrescentando 1,2 g de mistura de agarose a 43 ml de TAE 1X. Agitar para fragmentar os agregados.
2. Aquecer a mistura de agarose no microondas até estar completamente dissolvida (evitar que ferva até transbordar). Deixar arrefecer ligeiramente.
3. Adicionar 1,0 µl de brometo de etídio (10 mg/ml). Agitar o frasco. Note-se que o brometo de etídio é mutagénico, pelo que, para minimizar os riscos para a saúde dos trabalhadores, devem ser utilizados produtos químicos alternativos, na medida do possível do ponto de vista técnico¹.

¹ Em conformidade com o artigo 4.º, n.º 1, da Diretiva 2004/37/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativa à proteção dos trabalhadores contra riscos ligados à exposição a agentes cancerígenos ou mutagénicos durante o trabalho (sexta diretiva especial nos termos do n.º 1 do artigo 16.º da Diretiva 89/391/CEE do Conselho) (JO L 158 de 30.4.2004, p. 50).

4. Verter o gel para um molde, com um pente. Deixar arrefecer completamente.
5. Adicionar o gel ao aparelho. Cobrir o gel com TAE 1X.
6. Adicionar 1 μ l de 6x corante de dissociação a cada volume de 10 μ l de produto PCR.
7. Transferir as amostras para os poços utilizando uma pipeta.
8. Efetuar a eletroforese a 160 volts constantes durante ~20 minutos.

A **figura 1** apresenta uma imagem do gel de agarose com os padrões de bandas indicativos de um indivíduo macho e de um indivíduo fêmea.

Figura 1: Imagem do gel de agarose com o padrão de banda indicativo de um macho (♂) (banda única a ~203 bp: DMRT1) e de uma fêmea (♀) (duas bandas a ~259 bp: DM-W e 203 bp:DMRT1).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

Apêndice 6

DETERMINAÇÃO DA VITELOGENINA

A determinação da vitelogenina (VTG) efetua-se por recurso a um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), originalmente desenvolvido para a VTG do vairão-de-cabeça-grande (Parks *et al.*, 1999). Atualmente, não existem anticorpos disponíveis no mercado para *X. laevis*. No entanto, dada a grande quantidade de informações relativas a esta proteína e a existência de serviços comerciais de produção de anticorpos com uma boa relação custo-eficácia, é razoável que os laboratórios possam facilmente desenvolver um teste ELISA para efetuar esta medição (Olmstead *et al.*, 2009). Além disso, estes autores apresentam uma descrição do ensaio modificado para a VTG em *X. tropicalis*, conforme se descreve a seguir. O método utiliza um anticorpo produzido contra a VTG de *X. tropicalis*, que se sabe funcionar também para a VTG de *X. laevis*. Note-se que também podem ser utilizados testes ELISA não competitivos, os quais podem ter limites de deteção inferiores ao método que seguidamente se descreve.

Materiais e reagentes

- Soro com o 1.º anticorpo (Ac) pré-adsorvido

Misturar uma parte de soro contendo o 1.º anticorpo anti-VTG de *X. tropicalis* com duas partes de plasma de macho do grupo de controlo; deixar repousar à temperatura ambiente durante ~ 75 minutos, colocar em gelo durante 30 minutos, centrifugar > 20K x G durante 1 hora a 4 °C, retirar o sobrenadante, dividir em alíquotas e armazenar a -20 °C.

- 2.º anticorpo

Conjugado IgG de cabra anti-coelho-peroxidase de rábano (HRP) (por exemplo, Bio-Rad 172-1019)

- VTG padrão

VTG purificada de *X. laevis* a 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (por exemplo, KPL 50-76-00 ou Sigma T0440)
- Soro de cabra (NGS) (por exemplo, Chemicon® S26-100ml)
- Placas de microtitulação de 96 poços, de poliestireno EIA (por exemplo, ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- Forno de hibridação a 37 °C (ou incubadora de ar de equilíbrio rápido) para placas; banho-maria para tubos
- Outros equipamentos, produtos químicos e materiais comuns de laboratório.

Receitas

Tampão de revestimento (50 mM de tampão de carbonatos, pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
Água	428 ml

PBS 10X (0,1 M de fosfato, 1,5 M de NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
Água	810 ml

Tampão de lavagem (PBST):

PBS 10X	100 ml
Água	900 ml

Ajustar o pH para 7,3 com 1 M HCl e acrescentar 0,5 ml de Tween-20

Tampão de ensaio:

Soro de cabra (NGS)	3,75 ml
Tampão de lavagem	146,25 ml

Colheita de amostras

O sangue é colhido com um tubo capilar heparinizado para micro-hematócritos e colocado sobre gelo. Após centrifugação durante 3 minutos, o tubo é marcado, aberto e o plasma expelido para tubos de microcentrífuga de 0,6 ml com 0,13 unidades de aprotinina liofilizada (estes tubos são previamente preparados por adição da quantidade adequada de aprotinina, congelação e liofilização num concentrador de vácuo a baixos níveis de calor até à secagem completa). Armazenar o plasma a -80 °C até à análise.

Procedimento para uma placa

Revestimento da placa

Misturar 20 µl de VTG purificada com 22 ml de tampão de carbonatos (concentração final: 3 µg/ml). Adicionar 200 µl a cada poço de uma placa de 96 poços. Cobrir a placa com película de selagem adesiva e deixar incubar a 37 °C, durante 2 horas (ou a 4 °C, de um dia para o outro).

Bloqueio da placa

A solução de bloqueio é preparada adicionando 2 ml de soro de cabra (NGS) a 38 ml de tampão de carbonatos. Retirar a solução de revestimento e agitar até secar. Adicionar a cada poço 350 µl da solução de bloqueio. Cobrir com película de selagem adesiva e incubar a 37 °C, durante 2 horas (ou a 4 °C de um dia para o outro).

Preparação das soluções padrão

Misturar 5,8 µl de VTG purificada-padrão com 1,5 ml de tampão de ensaio, num tubo de ensaio de vidro de borossilicato descartável de 12 x 75 mm. Obtém-se assim uma concentração de 12 760 ng/ml. Em seguida, prepara-se uma diluição em série, adicionando 750 µl da diluição anterior a 750 µl de tampão de ensaio, para produzir concentrações finais de 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 e 50 ng/ml.

Preparação das amostras

Começar por uma diluição a 1:300 (por exemplo, misturar 1 µl de plasma com 299 µl de tampão de ensaio) ou a 1:30 do plasma em tampão de ensaio. Caso se preveja uma elevada concentração de VTG, poderão ser necessárias diluições suplementares ou de maiores quantidades. Tentar manter o valor B/B₀ no intervalo-padrão. Para as amostras sem VTG apreciável – por exemplo, machos e fêmeas de controlo (todos imaturos) –, utilizar a diluição a 1:30. As amostras com diluições inferiores a esta podem apresentar efeitos de matriz indesejáveis.

Além disso, recomenda-se a análise de uma amostra de controlo positivo em cada placa. Esta amostra provém de uma mistura de plasma que contém níveis de VTG altamente induzidos. A mistura de plasma é inicialmente diluída em NGS, dividida em alíquotas e armazenada a -80 °C. Para cada placa, uma alíquota é descongelada, diluída em tampão de ensaio e analisada como uma amostra de ensaio.

Incubação com o 1.º anticorpo

Preparar o 1.º Ac efetuando uma diluição a 1:2000 de soro contendo o 1.º Ac pré-adsorvido no tampão de ensaio (por exemplo, 8 µl para 16 ml de tampão de ensaio). Misturar 300 µl da solução contendo o 1.º Ac com 300 µl de amostra/padrão, num tubo de vidro. O tubo B₀ é preparado do mesmo modo, com 300 µl de tampão de ensaio e 300 µl de anticorpo. Além disso, deve preparar-se um tubo NSB com apenas 600 µl de tampão de ensaio, ou seja, sem Ac. Cobrir os tubos com Parafilm e agitar suavemente num vórtex, para misturar. Incubar

durante 1 hora em banho-maria, a 37 °C.

Lavagem da placa

Lavar a placa imediatamente antes de estar concluída a incubação do 1.º Ac. Para isso, sacudir a placa para retirar o conteúdo e secá-la com papel absorvente. Depois, encher os poços com 350 µl de solução de lavagem, esvaziar e secar. Neste caso, é útil a utilização de uma pipeta de repetição multicanais ou de um lavador de placas. Repetir mais duas vezes a lavagem, para um total de três lavagens.

Carregamento da placa

Uma vez lavada a placa, retirar os tubos do banho-maria e agitar ligeiramente num vórtex. Adicionar 200 µl de cada amostra padrão B₀ e tubo NSB, para duplicar os poços da placa. Cobrir a placa com película de selagem adesiva e deixar incubar, durante 1 hora, a 37 °C.

Incubação com o 2.º anticorpo

No fim da incubação da etapa anterior, a placa deve ser novamente lavada três vezes, como descrito acima. O 2.º Ac diluído prepara-se misturando 2,5 µl do 2.º Ac com 50 ml de tampão de ensaio. Adicionar 200 µl do 2.º Ac diluído a cada poço, selar como acima indicado e incubar durante 1 hora, a 37 °C.

Adicionar um substrato

Terminada a incubação com o 2.º Ac, proceder à lavagem da placa três vezes, conforme descrito acima. Em seguida, adicionar a cada poço 100 µl de substrato TMB. Deixar reagir durante 10 minutos, de preferência ao abrigo de uma fonte de luz viva. Interromper a reação adicionando 100 µl de ácido fosfórico 1 M. A mistura irá mudar de cor, de azul para amarelo vivo. Medir a absorvância a 450 nm, utilizando um leitor de placas.

Calcular B/B₀

Subtrair o valor NSB médio de todas as medições. Calcular o valor B/ B₀ para cada amostra e para cada padrão, dividindo o valor da absorvância (B) pela absorvância média da amostra (B₀).

Obter a curva padrão e determinar quantidades desconhecidas

Gerar uma curva-padrão por recurso a um *software* de criação de gráficos (por exemplo, Slidewrite™ ou Sigma Plot®), que irá extrapolar a quantidade de B/B₀ da amostra com base no B/B₀ dos padrões. Normalmente, a quantidade é representada por pontos numa escala logarítmica e a curva apresenta uma forma sigmoide. No entanto, pode parecer linear quando se utiliza um intervalo restrito de padrões. Corrigir as quantidades de amostra de acordo com o fator de diluição e registar em mg de VTG/ml de plasma.

Determinação dos limites mínimos de detecção (LMD)

Muitas vezes, em especial no que respeita aos machos normais, não é claro como se devem registar os resultados obtidos para valores baixos. Nestes casos, devem utilizar-se «limites de confiança» de 95 % para determinar se o valor deve ser registado como zero ou como outro número. Se o resultado da amostra se situar dentro do intervalo de confiança do padrão zero (B_0), o resultado deve ser registado como zero. O nível mínimo de detecção será o padrão mais baixo que seja consistentemente diferente do padrão zero (ou seja, os dois intervalos de confiança não se sobrepõem). Para qualquer resultado da amostra que esteja dentro do limite de confiança do nível mínimo de detecção, ou acima, regista-se o valor calculado. Se uma amostra estiver compreendida entre o padrão zero e os intervalos do nível mínimo de detecção, deve ser registada metade do nível mínimo de detecção para o valor dessa amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113-125.

Apêndice 7

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O LAGDA gera três tipos de dados a analisar estatisticamente: 1) dados quantitativos contínuos; 2) dados relativos ao tempo decorrido até ao evento, no que se refere às taxas de desenvolvimento (tempo até à fase NF62); 3) dados ordinais sob a forma de índices de gravidade ou fases de desenvolvimento a partir de avaliações histopatológicas. A figura 1 ilustra a árvore de decisão para análise estatística recomendada para o LAGDA. Além disso, indicam-se a seguir algumas anotações que podem ser necessárias para efetuar a análise estatística das medições do LAGDA. Para a árvore de decisão de análise, os resultados das medições para mortalidade, crescimento (peso e comprimento) e índice hepatossomático (IHS) devem ser analisados de acordo com «Outros parâmetros».

Dados contínuos

Numa primeira fase, verifica-se se os dados relativos aos parâmetros contínuos são monótonos, transformando-os em classes e, em seguida, procedendo a uma análise de variância (ANOVA) e comparando os contrastes lineares e quadráticos. Se os dados forem monótonos, convém aplicar o teste de Jonckheere-Terpstra às medianas dos replicados, não devendo ser efetuadas quaisquer análises subsequentes. No caso de dados de distribuição normal com variâncias homogêneas, também é aplicável o teste de Williams. Se os dados não forem monótonos (o contraste quadrático é significativo e o linear não o é), convém analisá-los utilizando um modelo ANOVA com efeitos mistos. Em seguida, os dados devem ser avaliados quanto à normalidade (utilizando, de preferência, o teste de Shapiro-Wilk ou o teste de Anderson-Darling) e à homogeneidade da variância (de preferência utilizando o teste de Levene). Ambos os ensaios são realizados com os resíduos do modelo ANOVA de efeitos mistos. Embora sejam preferíveis, os testes formais de normalidade e homogeneidade da variância podem ser substituídos pelo recurso a um parecer de peritos. Se os dados apresentarem uma distribuição normal e variâncias homogêneas, as hipóteses do modelo ANOVA com efeitos mistos são verificadas e o teste de Dunnett permite determinar os efeitos significativos do tratamento. Sempre que se verifique anormalidade ou heterogeneidade da variância, os pressupostos do teste de Dunnett são violados e procura-se transformar os dados para obter a sua distribuição normal e estabilizar a variância. Se não se encontrar uma transformação deste tipo, determina-se um efeito de tratamento significativo com um teste de Dunn. Sempre que possível, deve realizar-se um teste unilateral, por oposição a um teste bilateral, mas tal exige o parecer de um perito para determinar qual o teste mais adequado para um determinado parâmetro.

Mortalidade

Os dados relativos à mortalidade devem ser analisados durante todo o ensaio e expressos em percentagem de peixes mortos num determinado viveiro. Os girinos que não tenham

completado a metamorfose num dado período, os girinos que se encontrem na coorte das subamostras de larvas, as rãs juvenis selecionadas e todos os animais mortos devido a erro experimental devem ser considerados dados censurados e não devem ser incluídos no denominador do cálculo da percentagem. Antes de se proceder a qualquer análise estatística, as percentagens de mortalidade devem ser objeto de transformação do arco seno da raiz quadrada. A alternativa é utilizar o teste de Cochran-Armitage, com um eventual ajustamento de Rao-Scott em caso de sobredispersão.

Peso e comprimento (dados relativos ao crescimento)

Os machos e as fêmeas não são sexualmente dimórficos durante a metamorfose, pelo que os dados relativos ao crescimento da subamostra de larvas devem ser analisados independentemente do sexo. No entanto, os dados relativos ao crescimento dos juvenis devem ser analisados separadamente, em função do sexo genético. Pode ser necessária uma transformação logarítmica para estes parâmetros, uma vez que não é raro os dados relativos ao tamanho seguirem uma lei logarítmica normal.

Índice hepatossomático (IHS)

Os pesos hepáticos devem ser normalizados como proporções do peso corporal total (ou seja, IHS) e analisados separadamente com base no sexo genético.

Tempo até à fase NF62

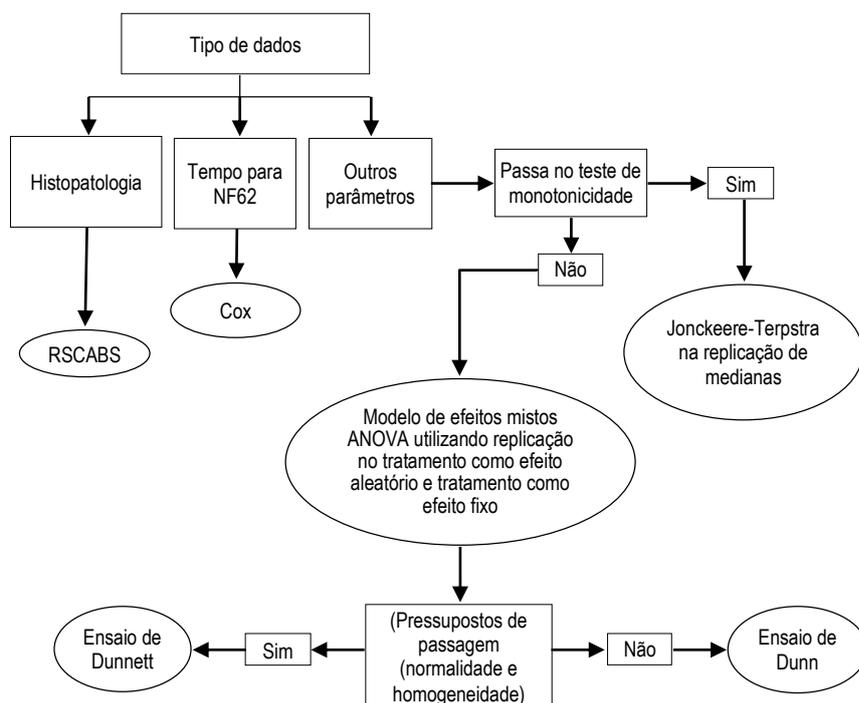
Os dados relativos ao tempo decorrido até à metamorfose devem ser tratados como dados até ao evento, sendo quaisquer mortalidades ou indivíduos que não atinjam a fase NF62 em 70 dias tratados como dados censurados à direita (ou seja, o valor verdadeiro é superior a 70 dias, embora o estudo termine antes de os animais terem atingido a fase NF62 em 70 dias). O tempo mediano até à fase NF62, que corresponde à conclusão da metamorfose nos controlos com água de diluição, deve ser utilizado para determinar a data de conclusão do ensaio. O tempo mediano até à conclusão da metamorfose pode ser determinado pelos estimadores produto-limite de Kaplan-Meier. Este parâmetro deve ser analisado por recurso a um modelo de riscos proporcionais de Cox com efeitos mistos, que tenha em conta a estrutura dos replicados do estudo.

Dados histopatológicos (índices de gravidade e fases de desenvolvimento)

Os dados histopatológicos assumem a forma de um índice da gravidade ou de fases de desenvolvimento. Um teste de tendência de Cochran-Armitage com correção do tipo Rao-Scott (RSCABS, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) é aplicado a cada nível de gravidade numa resposta histopatológica (Green *et al.*, 2014). A correção de Rao-Scott permite que seja tido em conta no ensaio o plano da experiência adotado para os replicados. O procedimento «by Slices» incorpora as expectativas biológicas de que a gravidade dos efeitos tende a aumentar com o aumento das doses ou concentrações, mantendo os índices

dos indivíduos e indicando a gravidade dos efeitos detetados. O procedimento RSCABS não só determina quais os tratamentos que são estatisticamente diferentes dos controlos (ou seja, que têm uma patologia mais grave do que os controlos), mas também determina a que índice de gravidade a diferença ocorre, proporcionando assim o contexto tão necessário à análise. No caso da determinação da fase de desenvolvimento das gónadas e dos ductos reprodutores, convém submeter os dados a uma manipulação suplementar, uma vez que uma das hipóteses do RSCABS é que a gravidade do efeito aumenta com a dose. O efeito observado pode ser um atraso ou uma aceleração do desenvolvimento. Por conseguinte, os dados relativos à determinação da fase de desenvolvimento devem ser analisados tal como foram comunicados para detetar uma eventual aceleração do desenvolvimento e, em seguida, invertidos manualmente antes de uma segunda análise para detetar um eventual atraso no desenvolvimento.

Figura 1: Árvore de decisão para análise estatística para os dados LAGDA.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

Apêndice 8

ELEMENTOS A TER EM CONTA PARA O ACOMPANHAMENTO E A MINIMIZAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ESCOLIOSE

A escoliose idiopática, geralmente manifestada por uma «cauda dobrada» nos girinos de *Xenopus laevis*, pode complicar as observações morfológicas e comportamentais nas populações de ensaio. Devem ser envidados esforços para minimizar ou eliminar a incidência de escoliose, tanto nas populações de reserva como em condições experimentais. No ensaio definitivo, recomenda-se que a prevalência de escoliose moderada e grave seja inferior a 10 %, a fim de reforçar a confiança na capacidade do ensaio para detetar efeitos no desenvolvimento relacionados com o tratamento em larvas de anfíbios de outro modo saudáveis.

As observações diárias durante o ensaio definitivo devem registar tanto a incidência (contagem individual) como a gravidade da escoliose, quando presente. A natureza da anomalia deve ser descrita no que diz respeito à localização (por exemplo, anterior ou posterior à cloaca) e à direção da curvatura (por exemplo, lateral ou dorso-ventral). A gravidade pode ser classificada como se segue:

(NO) não observada: ausência de curvatura

(1) Mínima: ligeira curvatura lateral posterior à cloaca; apenas visível em repouso

(2) Moderada: curvatura lateral posterior à cloaca; sempre visível, mas sem inibir o movimento

(3) Grave: curvatura lateral anterior à cloaca, OU qualquer curvatura que iniba o movimento, OU qualquer curvatura dorso-ventral

Um painel científico consultivo da US EPA sobre a lei FIFRA (FIFRA SAP 2013) analisou dados recapitulativos sobre a escoliose resultantes de quinze ensaios de metamorfose de anfíbios com *X. laevis* (fase NF51 a 60+) e formulou recomendações gerais para reduzir a prevalência desta anomalia nas populações de ensaio. Estas recomendações são relevantes para o LAGDA, embora este ensaio implique um calendário de desenvolvimento mais longo.

Dados históricos relativos à desova

De um modo geral, devem utilizar-se como casais reprodutores adultos saudáveis de alta qualidade; a eliminação de casais reprodutores que produzem descendência com escoliose pode minimizar a ocorrência desta ao longo do tempo. Especificamente, pode ser benéfico

minimizar a utilização de casais reprodutores capturados na natureza. O período de exposição do LAGDA começa com embriões na fase NF8-10; não é possível prever, à partida, se determinados indivíduos irão ou não apresentar escoliose. Assim, para além de acompanhar a incidência de escoliose nos animais de ensaio, devem documentar-se os dados históricos relativos às massas de ovos – incluindo a prevalência de escoliose em quaisquer larvas autorizadas a desenvolver-se. Pode ser útil monitorizar melhor a parte de cada massa de ovos não utilizada num determinado estudo e comunicar essas observações (FIFRA SAP 2013).

Qualidade da água

É importante garantir a qualidade da água, tanto nas reservas do laboratório como durante o ensaio. Para além dos critérios de qualidade da água avaliados regularmente para os ensaios de toxicidade em meio aquático, pode ser útil monitorizar e corrigir eventuais deficiências de nutrientes (por exemplo, deficiência de vitamina C, cálcio, fósforo) ou níveis excessivos de selênio e de cobre, que se sabe poderem causar escoliose em diferentes graus em *Rana* sp. de criação laboratorial e em *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; como indicado em FIFRA SAP 2013). A utilização de um regime alimentar adequado (ver apêndice 4) e a limpeza regular dos viveiros permitem, em geral, melhorar a qualidade da água e a saúde dos espécimes de ensaio.

Regime alimentar

O apêndice 4 contém recomendações específicas relativas ao regime alimentar, considerados eficazes no âmbito do LAGDA. Recomenda-se que as fontes de alimentos sejam analisadas para deteção de toxinas biológicas, herbicidas e outros pesticidas que se saiba causarem escoliose em *X. laevis* ou noutros animais aquáticos (Schlenk e Jenkins 2013). Por exemplo, a exposição a determinados inibidores da colinesterase foi associada à escoliose nos peixes (Schultz *et al.* 1985) e nas rãs (Bacchetta *et al.* 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13:

322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, and P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21 a 23 de maio de 2013. Washington, DC. »