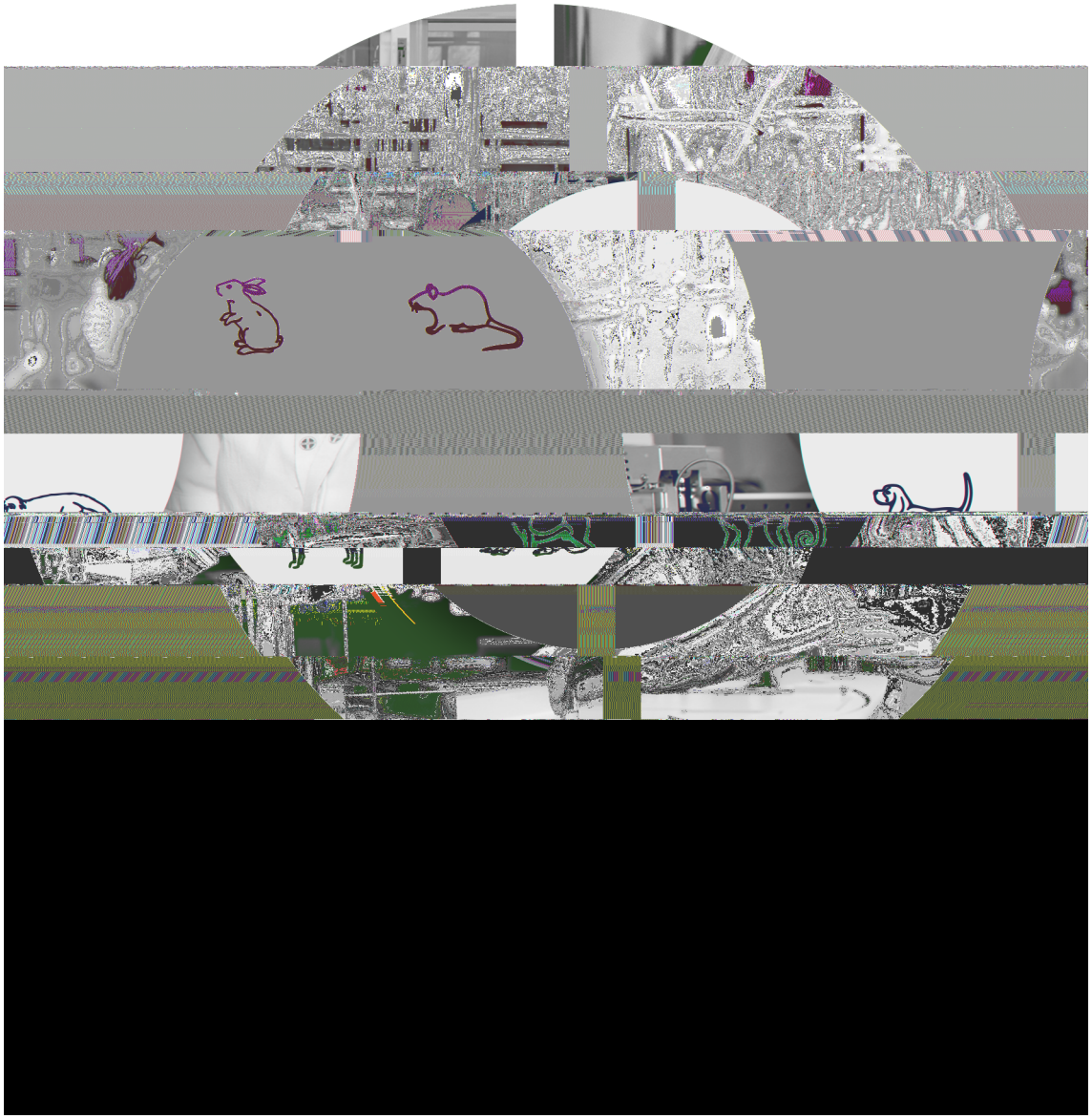
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial

São Paulo - Brasil - 2019
Projeto – ACFB/ANF – ABDI

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Agência Brasileira do ISBN - Bibliotecária Priscila Pena Machado CRB-7/6971

M845 Moretto, Lauro Domingos.
Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil / Lauro Domingos Moretto e Marco Antonio Stephano. — São Paulo : Limay, 2019.
732 p. ; 21 cm.

Inclui bibliografia.
ISBN 978-85-66138-01-06

1. Animais de laboratório - Legislação - Brasil. 2. Bioética. 3. Diagnóstico de laboratório. I. Stephano, Marco Antonio. II. Título.

CDD 179.4

Autores:
Prof. Dr. Lauro Domingos Moretto
Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

1ª edição

São Paulo
Limay Editora
2019

Expediente
Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial – ABDI

Presidente
Luiz Augusto de Souza Ferreira

Diretor de Desenvolvimento Produtivo e Tecnológico
Miguel Antônio Cedraz Nery

Gerente de Desenvolvimento Produtivo e Tecnológico
Cynthia Araújo Nascimento Mattos

Chefe de Gabinete
Tainá Serra Pimentel

Coordenadora de Difusão Tecnológica
Talita Daher

Coordenador de Comunicação
Gustavo Henrique Ferreira Gouvêia

Equipe Técnica ABDI
Cleila Guimarães Pimenta Bosio
Cynthia Araújo Nascimento Mattos
Ruth Camilo de Oliveira
Talita Daher

Equipe Técnica ACFB/ANF
Lauro Domingos Moretto
Marco Antonio Stephano
Raquel Duarte de Toledo

Projeto Editorial
Limay Editora

Revisão
Joralima Texto – Revisor ortográfico
Lauro Domingos Moretto – Revisor Técnico
Marco Antonio Stephano– Revisor Técnico

Diagramação
André Chiodo Silva
Daniela Silvestre de Lima
Gil M. Santos

Arte finalista
Andre Chiodo Silva

Tradução
Anamaria Caires

Prefácio

Um passo importante foi dado no Brasil quando a sociedade científica brasileira e o Congresso Nacional se empenharam para que tivéssemos um marco regulatório de proteção aos animais utilizados para propósitos científicos e didáticos. Essa articulação culminou na Lei 11.794/08 (conhecida como Lei Arouca – em homenagem ao médico sanitarista e político brasileiro Antônio Sérgio da Silva Arouca), promulgada em 8 de outubro de 2008.

A Lei Federal 11.794/08 criou o Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), ligado ao Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação (MCTIC), e representa uma mudança substantiva porque coloca o Brasil no patamar das nações desenvolvidas.

A regulamentação traz em seus princípios, implícitas, a análise crítica e a defesa do uso de animais em laboratório em situações experimentais, para que, assim, a sociedade compreenda e aceite tais procedimentos. Tarefa difícil, consolidada por meio de normas, diretrizes de trabalho e guias, que atualmente orientam pesquisadores do nosso país nas diversas áreas de conhecimento.

O CONCEA se tornou o guardião da ética e o garantidor do bem-estar dos animais utilizados na ciência, sendo responsável pelas regras que regem o seu uso tanto na pesquisa quanto no ensino. É esse Conselho que também é responsável por credenciar as instituições implicadas em atividades de pesquisa e ensino envolvendo animais, controlando e organizando a experimentação em todo o território nacional e promovendo a discussão e a modernização contínua dos regulamentos, de acordo com as melhores práticas mundiais.

Dentre as inúmeras prerrogativas, cabe ao CONCEA estabelecer normas para o uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, bem como zelar pela adoção de técnicas para instalação e funcionamento de biotérios, centros de criação e de laboratórios de experimentação animal. Cabe ao CONCEA, ainda, a tarefa de administrar o cadastro dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no nosso país, em cooperação com as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) atuantes em todos os estabelecimentos que utilizam animais, conforme estabelece a Lei Arouca.

Quanto à implementação de metodologias alternativas, o CONCEA, desde a sua criação, estabeleceu uma **Câmara Permanente de Métodos Alternativos ao Uso de Animais**, que permitiu o avanço dessa importante área do conhecimento através do estabelecimento das diretrizes regulatórias para a implantação de métodos alternativos validados ao uso científico de animais em todo território nacional.

Nesse particular, em 2012, foi estabelecida a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), sob a liderança do MCTIC. A RENAMA tem o objetivo de promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de tecnologias e de métodos alternativos ao uso de animais para os testes de segurança e de eficácia de medicamentos e cosméticos. O Conselho Diretor da RENAMA é composto pelos principais interlocutores da área (INMETRO, ANVISA, INCQS, LNBio, BraCVAM, CNPq, ABDI, CONCEA), mostrando o diálogo entre governo (através do MCTIC) e sociedade em prol de práticas científicas efetivamente aceitáveis e defensáveis.

Outra importante ação conjunta na direção da substituição de animais utilizados em pesquisa foi o fomento à pesquisa, através de chamada pública lançada pelo CNPq, em parceria com MCTIC. As chamadas apoiaram a RENAMA, incentivando projetos de pesquisa na área de Métodos Alternativos ao Uso de Animais em Experimentação.

Em consonância com esse processo, a Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil (ACFB) e a Academia Nacional de Farmácia (ANF), juntamente com a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), prestam um serviço muito importante, que atende às demandas dos pesquisadores brasileiros para o entendimento do que foi feito no país nessa área. O atual compêndio **"Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil"** contribui de forma organizada e efetiva, descrevendo quais são os métodos substitutivos que deveremos empregar no país.

O Brasil segue um caminho ético e promissor para substituição efetiva, sempre que possível, dos animais em pesquisa e ensino, com técnicas comprovadamente eficazes do ponto de vista científico. Devemos celebrar o Convênio da ACFB/ANF com a ABDI que culminou na elaboração desse compêndio em língua portuguesa, com os métodos alternativos ao uso de animais reconhecidos pelo CONCEA e aceitos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Parabéns aos autores e colaboradores por essa importante iniciativa.

Marcelo Marcos Morales
Professor Titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Membro da Academia Nacional de Farmácia
Membro da Academia Nacional de Medicina
Ex-coordenador do CONCEA

Prefácio **06**

Sobre as instituições **11**

ACFB - Academia de Ciência Farmacêuticas do Brasil 11

ABDI - Agência Brasileira de Deenvolvimento Industrial 12

OECD/OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico 13

Premissas e apresentação (introdução) **14**

Legislação e regulamentação **17**

Lei no 11.794, de 08.10.2008 17

Decreto no 6.899, de 15.07.2009 26

Resolução Normativa CONCEA nº 17, de 03.07.2014 44

Resolução Normativa CONCEA nº 18, de 24.09.2014 46

Resolução Normativa CONCEA nº 31, de 18.08.2016 51

RDC Nº 35, de 07.08.2015, ANVISA 52

I - Para avaliação do potencial de sensibilização, de irritação e de corrosão da pele: **55**

Método OECD DT 430 - Corrosão cutânea *in vitro*: teste de resistência elétrica transcutânea; 55

Método OECD DT 431 - Corrosão cutânea *in vitr*o: teste da epiderme humana reconstituída; 76

Método OECD DT 435 - Teste de membrana de barreira *in vitro* para corrosão da pele 109

Método OECD DT 439 - Irritação cutânea in vitro: método de reconstrução da epiderme humana 125

Método OECD DT 429 - Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local 154

Método OECD DT 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local 182

Método OECD DT 442C - Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade do peptídeo (DPRA) 252

Método OECD DT 442D - Ensaios de sensibilização cutânea *in vitro* que abordam o evento aop chave sobre a ativação do queratinócito 277

II - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular: **340**

a) Método OECD DT 437 - Método de Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina para Identificação: 340

i) Substâncias Químicas Indutoras de Danos Oculares Graves e

ii) Substâncias Químicas que Não Requerem Classificação para Irritação nos Olhos ou para Dano Ocular Grave

Método OECD DT 438 - Método de teste ocular isolado da galinha, para identificar: I) substâncias químicas que provocam lesões oculares graves e II) substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves 369

Método OECD DT 460 - Método de teste de vazamento de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e irritantes severos 404

Método OECD DT 491 - Método de teste in vitro de exposição a curto prazo para identificação de:
I) substâncias químicas que produzem danos graves ao olho e
II) produtos químicos que não requerem classificação para irritação ocular ou dano sério ao olho 424

Método OECD DT 492 - Método de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE) reconstruído para identificar substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular grave 443

III - Para avaliação do potencial de Fototoxicidade: 494

Método OECD DT 432 - Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU. 494

IV - Para avaliação da absorção cutânea: 515

Método OECD DT 428 - Absorção Cutânea método *in vitro*. 515

V - Para avaliação de toxicidade aguda: 525

Método OECD DT 129 - Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda 525

Método OECD DT 420 - Toxicidade oral aguda – procedimento de dose fixa 574

Método OECD DT 423 - Toxicidade oral aguda – método de classe de toxicidade aguda 591

Método OECD DT 425 - Toxicidade oral aguda – protocolo “up-and-down” 608

VI - Para avaliação de genotoxicidade 643

Método OECD DT 487 - Teste de micronúcleos em células de mamíferos *in vitro* 643

VII – Para Avaliação de toxicidade reprodutiva: 681

Método OECD DT 421 - Teste de triagem de reprodução/ desenvolvimento de toxicidade 681

Método OECD DT 422 - Estudo combinado de toxicidade de dose repetida com o teste de triagem para reprodução/toxicidade no desenvolvimento 703

Rio de Janeiro, janeiro de 2019.

Mensagem da Diretoria

A Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil / Academia Nacional de Farmácia – ACFB/ANF, está apresentando mais um trabalho inovador no campo das Ciências Farmacêuticas, o compêndio "MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA RECONHECIDOS NO BRASIL", o qual será distribuído aos cientistas brasileiros.

Esse projeto foi realizado mediante convênio estabelecido com a ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, com a finalidade de disponibilizar os métodos elaborados pela OECD, traduzidos para a língua portuguesa e, assim, contribuir para o atendimento ao disposto na regulamentação de pesquisas estabelecidas pelo CONCEA – Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal e reconhecidos pela ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

A Diretoria da Academia sente-se honrada por ter sido contemplada com recursos da ABDI para a realização deste projeto, o qual contribuirá de forma efetiva para o desenvolvimento das pesquisas não clínicas e clinicas de fármacos e medicamentos no Brasil.

Em nome da Diretoria quero registrar os agradecimentos aos Acadêmicos, Lauro Domingos Moretto e Marco Antonio Stephano, autores do projeto e líderes nesta área do conhecimento, que se empenharam nesta empreitada.

Atenciosamente

João Paulo S. Vieira

Acadêmico Presidente

Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil/
Academia Nacional de Farmácia.

Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil / Academia Nacional de Farmácia

A Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil / Academia Nacional de Farmácia – ACFB/ANF é uma sociedade civil científica, de âmbito nacional, que tem como objetivos: estudar, debater, divulgar, educar e colaborar como órgão consultivo em atividades nacionais e internacionais, em tudo o que se relacione com as Ciências Farmacêuticas.

Fundada em 13 de agosto de 1937, com sede na cidade do Rio de Janeiro, e reconhecida com Título de Utilidade Pública, a ACFB/ANF é uma das mais longevas sociedades científicas brasileiras na área farmacêutica. Nasceu do Conselho Científico da Associação Brasileira de Farmacêuticos. É composta de membros titulares que são cientistas farmacêuticos, médicos, odontologistas e outros de várias áreas do conhecimento. Também é composta por membros eméritos, honorários, correspondentes e mantenedores.

Os membros titulares simbolicamente ocupam cadeiras que têm como patronos farmacêuticos e cientistas brasileiros notáveis. As cadeiras, em número de 100, são distribuídas nas seções de Farmácia; Farmácia Industrial; Ciências (Físicas, Químicas, Biológicas, Biotecnológicas e Naturais); Farmacologia; Medicina Humana; Medicina Veterinária e Odontologia.

A ACFB/ANF organiza e realiza simpósios e conferências para disseminar as mais recentes pesquisas que constituem as fronteiras das Ciências Farmacêuticas em seus diferentes eixos temáticos que incluem a educação, as ciências básicas e aplicadas, a tecnologia, a regulamentação e o acesso aos medicamentos. Estimula a vocação profissional através da organização e participação em simpósios e congressos.

A ACFB/ANF desenvolve atividades que tem por finalidade promover a disseminação do conhecimento científico e tecnológico, com vistas ao processo de integração entre cientistas que atuam no ensino e pesquisas com os profissionais do segmento farmacêutico, que se dedicam à conversão desse conhecimento em produtos e serviços inovadores.

Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI)

A Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), sob a supervisão do Ministério da Economia, se consolidou, ao longo de 14 anos de existência, como a agência de inteligência do Governo Federal para o setor produtivo. Ligada à Secretaria de Produtividade, Emprego e Competitividade (Sepec) do Ministério da Economia, a ABDI possui um quadro técnico enxuto, ágil e qualificado para desenvolver estratégias e ações voltadas à promoção da inovação e da competitividade do país.

Criada pela necessidade de gerar inteligência competitiva e articulação entre instâncias públicas e privadas e, principalmente, entre os diversos órgãos federais e regionais que atuam no desenvolvimento industrial, a ABDI tem a missão de ser indutora da cultura de digitalização da economia e cumpre papel significativo no processo de formulação e execução de programas e projetos voltados para a transformação digital do setor produtivo brasileiro.

Entre os projetos de destaque estão: a implantação e disseminação do Building Information Modelling (BIM) na construção civil; o Laboratório de Inovação do Varejo (ProVA); o estímulo da conexão entre startups e empresas como instrumento de transformação digital (Digital Challenges); o Living Lab de Tecnologias para Cidades Inteligentes; a identificação e apoio de tecnologias inovadoras em defesa e cibersegurança, entre outras ações e programas voltados para a disseminação da Indústria 4.0.

Saiba mais em www.abdi.com.br.

Siga-nos nas redes: Facebook, Twitter, Instagram, Linkedin, Youtube.

Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

A OCDE é um fórum único onde governos trabalham em conjunto para resolver os desafios econômicos, sociais e ambientais referente à globalização. A OCDE mede a produtividade e os fluxos globais de comércio e investimento, analisando e comparando dados para prever tendências futuras. Estabelece, também, padrões internacionais em várias atividades econômicas, desde agricultura e impostos até a segurança de produtos químicos e métodos analíticos.

Os países membros da OCDE são: Austrália, Áustria, Bélgica, Canadá, Chile, República Checa, Dinamarca, Estónia, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Hungria, Islândia, Irlanda, Israel, Itália, Japão, Coréia do Sul, Luxemburgo, México, Holanda, Nova Zelândia, Noruega, Polônia, Portugal, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Suécia, Suíça, Turquia, Reino Unido e Estados Unidos. A União Europeia participa dos trabalhos da OCDE.

OCDE Publicações divulga amplamente os resultados da Organização referentes as pesquisas sobre economia, ação sociais e ambientais. O traço comum do trabalho da OCDE é um compromisso compartilhado com economias de mercado apoiadas por instituições democráticas e focadas no bem-estar de todos os cidadãos.

© 2019 OCDE Todos os direitos reservados em relação aos métodos alternativos em inglês

© 2019 Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil para a edição em Português do Brasil.

A qualidade desta tradução e sua coerência referente ao texto original são de responsabilidade da Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil.

Premissas, objetivos e apresentação

O projeto constante no Convênio da Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil, da Academia Nacional de Farmácia (ACFB/ANF) com a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), estabelecido em convênio de 23 de agosto de 2018, tem duas metas específicas, a saber: elaborar um compêndio, em língua portuguesa, com os métodos alternativos ao uso de animais – que foram reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aceitos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – e organizar duas oficinas para expor os objetivos do projeto.

As oficinas têm por objetivo expor os princípios de cada método e permitir a distribuição dos compêndios aos profissionais e às instituições que se dedicam às pesquisas destinadas aos estudos de eficácia e segurança de produtos utilizados nas terapêuticas humana e animal, cosméticos, produtos para a saúde e defensivos fitossanitários previstos na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

A Lei nº 11.794/2008 estabeleceu que é de atribuição do CONCEA reconhecer os métodos alternativos aplicados à redução, ao refinamento e à substituição de animais em pesquisas. A Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014, do CONCEA estabeleceu os critérios para o reconhecimento dos métodos alternativos ao uso de animais em ensino e pesquisa no Brasil, enquanto as resoluções de nº 18, de 24 de setembro de 2014, e nº 31, de 18 de agosto de 2016, relacionaram os métodos validados. Já a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, RDC nº 35, de 7 de agosto de 2015, dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA nas petições submetidas à análise na referida agência.

O projeto da ACFB/ANF aprovado pela ABDI tem alguns objetivos, dentre os quais se incluem: suprir a necessidade de adotar textos em língua portuguesa de metodologias utilizadas em pesquisas, desenvolvimento tecnológico e controle de qualidade, atender a exigência legal de se utilizar texto em língua portuguesa nos documentos entregues a órgãos públicos e, muito especialmente, oferecer um compêndio que tenha por escopo disseminar o conhecimento relativo aos métodos da OECD, reconhecidos e aceitos no Brasil, a estudantes, docentes e profissionais.

A missão da ACFB/ANF tem sido gradualmente consolidada, desde seus primórdios, como defensora, propulsora e impulsionadora da inovação nos assuntos relacionados às ciências farmacêuticas no Brasil. Por isso, sente-se, juntamente com a ABDI, gratificada pela oportunidade de oferecer mais uma contribuição ao desenvolvimento científico brasileiro.

O compêndio "Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil" é o produto resultante dos esforços conjuntos da ACFB/ANF e da ABDI para atender à demanda de pesquisadores brasileiros.

O CONCEA, criado pela Lei nº 11.794, de 2008, e regulamentado pelo Decreto nº 6.899, de 2009, é a autoridade nacional responsável por formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino ou pesquisa científica, tendo o dever de estabelecer os critérios, os limites e as definições contidos na referida Lei.

Conhecido internacionalmente como "Princípio dos 3Rs" (em língua inglesa *reduction, refinement and replacement*), ainda na década dos anos 1950, a comunidade científica internacional continua se esforçando para segui-lo, ao mesmo tempo que instituições públicas e privadas alocam recursos humanos e financeiros para desenvolver novas metodologias.

Este compêndio reuniu os métodos alternativos elaborados pela OECD/OCDE, que foram reconhecidos pelo CONCEA e aceitos pela ANVISA, traduzindo-os para a língua portuguesa, com a finalidade de torná-los acessíveis aos pesquisadores e profissionais que necessitem utilizá-los.

A tradução, para a língua portuguesa, dos originais em inglês, além de atender aos aspectos legais também contribui para o correto entendimento do conteúdo dos métodos por pessoas que nem sempre têm amplo domínio da língua inglesa.

Os métodos que constam deste livro foram ordenados pelos critérios de finalidade de uso, ou seja: avaliação da irritação da pele, da irritação ocular, da toxicidade aguda e da absorção cutânea.

Além da convicção de que a adoção desses métodos da OECD contribua para a aplicação do "Princípio dos 3Rs", entende-se que o uso de métodos alternativos

possibilitará a compreensão científica dos mecanismos moleculares, celulares e fisiológicos que promovem as reações e os fenômenos de irritação ocular, toxicidade aguda e absorção cutânea.

Acredita-se, ainda, que a adoção dos métodos alternativos possa contribuir para a aceleração do processo de avaliação de novos produtos, com potencial redução de tempo e de custos para que sejam colocados à disposição da população.

Os métodos analíticos alternativos constantes deste compêndio são categorizados como validados, ou seja, são confiáveis e relevantes para os propósitos a que se destinam e são reconhecidos por instituições internacionais e pelo CONCEA. Desta forma, asseguram resultados semelhantes e com reprodutibilidade.

O compêndio "Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil" constitui uma contribuição para a capacitação de profissionais com vistas a atender ao prazo estabelecido na Resolução Normativa do CONCEA que concedeu 5 anos para que o uso de métodos alternativos seja obrigatório em todo o território brasileiro.

O conteúdo deste compêndio está organizado de modo a facilitar a compreensão do assunto, iniciando-se com a reprodução da legislação e regulamentação que disciplina o uso de métodos alternativos ao uso de animais em pesquisas. Sequencialmente, estão disponibilizados os métodos alternativos que estão agrupados em blocos, a saber: I. Avaliação do potencial de sensibilização, de irritação e de corrosão da pele; II. Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular; III. Avaliação do potencial de fototoxicidade; IV. Avaliação da absorção cutânea; V. Avaliação da toxicidade aguda; VI. Avaliação de genotoxicidade; VII. Avaliação de toxicidade reprodutiva e VIII. Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis.

Registramos os agradecimentos às equipes da ACFB/ANF e da ABDI que, em conjunto, se dedicaram a este projeto.

Lauro D. Moretto

Marco Antonio Stephano

LEGISLAÇÃO E REGULAMENTAÇÃO

Lei no 11.794, de 08.10.2008

Presidência da República

Casa Civil

Subchefia para Assuntos Jurídicos

LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.

Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA - Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

CAPÍTULO I

DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º. A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º. A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – Estabelecimentos de ensino superior;

II – Estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º. São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º. Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º. O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo Chordata, subfilo Vertebrata, observada a legislação ambiental.

Art. 3º. Para as finalidades desta Lei entende-se por:

I - Filo Chordata: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único;

II - Subfilo Vertebrata: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral;

III - experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenônemos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

IV - morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental.

Parágrafo único. Não se considera experimento:

I - a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite;

II - o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro;

III - as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

CAPÍTULO II

DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA

Art. 4º. Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Art. 5º. Compete ao CONCEA:

I - formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II - credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III - monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV - estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V - estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI - estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII - manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8o desta Lei;

VIII - apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX - elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X - assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º. O CONCEA é constituído por:

I - Plenário;

II - Câmaras Permanentes e Temporárias;

III Secretaria-Executiva.

§ 1º. As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno.

§ 2º. A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º. O CONCEA poderá valer-se de consultores ad hoc de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º. O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I – 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

a) Ministério da Ciência e Tecnologia;

b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

c) Ministério da Educação;

d) Ministério do Meio Ambiente;

e) Ministério da Saúde;

f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil – CRUB;

h) Academia Brasileira de Ciências;

i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;

j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;

l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;

II - 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1º. Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na Presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério.

§ 2º. O Presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3º. Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados, considerados para todos os efeitos, de relevante serviço público.

CAPÍTULO III

DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUAs

Art. 8º. É condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs.

Art. 9º. As CEUAs são integradas por:

I - médicos veterinários e biólogos;

II - docentes e pesquisadores na área específica;

III - 1 (um) representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País, na forma do Regulamento.

Art. 10º. Compete às CEUAs:

I - cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II - examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III - manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV - manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;

V - expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros;

VI - notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º. Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º. Quando se configurar a hipótese prevista no § 1o deste artigo, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 e 20 desta Lei.

§ 3º. Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º. Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 5º. Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

CAPÍTULO IV

DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO E PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei.

§ 1º (VETADO)

§ 2º (VETADO)

§ 3º (VETADO)

Art. 12. A criação ou a utilização de animais para pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

§ 1º A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º. Na hipótese prevista no § 1º deste artigo, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob seu controle.

Art. 14º. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º. O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º. Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos a eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

§ 7º. É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º. É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º. Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10º. Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15º. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

CAPÍTULO V

DAS PENALIDADES

Art. 17º. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de:

I – Advertência;

II – Multa de R$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R$ 20.000,00 (vinte mil reais);

III - interdição temporária;

IV - suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

V - interdição definitiva.

Parágrafo único. A interdição por prazo superior a 30 (trinta) dias somente po-

derá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvido o CONCEA.

Art. 18º. Qualquer pessoa que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA será passível das seguintes penalidades administrativas:

I - Advertência;

II - Multa de R$ 1.000,00 (mil reais) a R$ 5.000,00 (cinco mil reais);

III - Suspensão temporária;

IV – interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei.

Art. 19º. As penalidades previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator.

Art. 20º. As sanções previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal.

Art. 21º. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, da Educação, da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente, nas respectivas áreas de competência.

CAPÍTULO VI

DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 22. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei deverão:

I - Criar a CEUA, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, após a regulamentação referida no art. 25 desta Lei;

II - Compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA, com base no inciso V do caput do art. 5º desta Lei.

Art. 23. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos por qualquer dos seguintes motivos:

I - Que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

II - Cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 24. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 25. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias.

Art. 26. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 27. Revoga-se a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979.

Brasília, 8 de outubro de 2008; 187º da Independência e 120o da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA

Tarso Genro
Reinhold Stephanes
José Gomes Temporão
Miguel Jorge
Luiz Antonio Rodrigues Elias
Carlos Minc
Este texto não substitui o publicado no DOU de 9.10.2008.

Presidência da República

Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos
DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimen-

tação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 84, incisos IV e VI, alínea "a", da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 25 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

DECRETA:

CAPITULO I

DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES E GERAIS

Art. 1º. As atividades e projetos que envolvam a criação e utilização de animais de laboratório pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, exceto o homem, destinados ao ensino e à pesquisa científica ficam restritas ao âmbito de entidades de direito público ou privado, que serão responsáveis pela obediência aos preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, deste Decreto e de normas complementares, bem como pelas eventuais consequências ou efeitos advindos de seu descumprimento.

I. As atividades e projetos de que trata este artigo são vedados a pessoas físicas em atuação autônoma e independente, ainda que mantenham vínculo empregatício ou qualquer outro com pessoas jurídicas.
II. As instituições interessadas em realizar atividade prevista neste Decreto deverão requerer seu credenciamento junto ao Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA.

Art. 2º. Além das definições previstas na Lei nº 11.794, de 2008, considera-se, para os efeitos deste Decreto:

I - *Subfilo Vertebrata:* animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral, excluindo os primatas humanos;
II - *Métodos Alternativos:* procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir,

sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que:

a) não utilizem animais;
b) usem espécies de ordens inferiores;
c) empreguem menor número de animais;
d) utilizem sistemas orgânicos ex vivos; ou
e) diminuam ou eliminem o desconforto.

III - *Atividades de Pesquisa Científica:* todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle de qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

Parágrafo único. O termo pesquisa científica adotado neste Decreto inclui as atividades de desenvolvimento tecnológico, de acordo com a definição constante do § 2º do art. 1º da Lei nº 11.794, de 2008, e a do inciso III deste artigo.

CAPÍTULO II

DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA

Seção I

Da Natureza e Finalidade

Art. 3º. O CONCEA, órgão integrante da estrutura do Ministério da Ciência e Tecnologia, é instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal, para coordenar os procedimentos de uso científico de animais.

Seção II

Das Atribuições

Art. 4º. Compete ao CONCEA:

I - Formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária e ética de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II - Credenciar instituições para criação ou utilização de animais com finalidade de ensino ou pesquisa científica;

III - Monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino ou pesquisa científica;

IV - Estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa científica, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V - Estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI - Estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII - Manter cadastro atualizado de protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º da Lei nº 11.794, de 2008;

VIII - Elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

IX - Assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa científica tratadas na Lei nº 11.794, de 2008;

X - Administrar, por sua Secretaria-Executiva, o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, de que trata o art. 41, destinado ao registro obrigatório das instituições que exerçam atividades de criação ou utilização de animais em ensino ou pesquisa científica;

XI - Apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs, bem como de sua Secretaria-Executiva; e

XII - Aplicar as sanções previstas nos arts. 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 2008.

Art. 5º. Cabe ao Presidente do CONCEA, entre outras atribuições a serem definidas no regimento interno:

I - Representar o CONCEA;

II - Convocar as reuniões do CONCEA e aprovar as respectivas pautas propostas pela Secretaria-Executiva;

III - Presidir, com direito a voto de qualidade, a reunião plenária do CONCEA;

IV - Convidar a participar das reuniões e debates, consultado o CONCEA, sem direito a voto, pessoas que possam contribuir para as discussões dos assuntos tratados;

V - Delegar suas atribuições.

Art. 6º. Cabe ao Secretário-Executivo do CONCEA, entre outras atribuições a serem definidas no regimento interno:

I - garantir a publicidade e o acesso aos atos do CONCEA;

II - determinar a prestação de informações e franquear acesso a documentos, solicitados pelos órgãos de registro e fiscalização.

Art. 7º. Cabe ao Coordenador do CONCEA, entre outras atribuições a serem definidas no regimento interno:

I - Presidir a reunião plenária do CONCEA, na ausência do seu Presidente e do Secretário-Executivo do Ministério da Ciência e Tecnologia; e

II - Exercer as atribuições delegadas pelo Presidente do CONCEA.

Art. 8º. Cabe aos membros do CONCEA:

I - Comparecer, participar e votar nas reuniões do CONCEA;

II - Propor a convocação de reuniões extraordinárias do CONCEA, na forma do regimento interno;

III - Examinar e relatar expedientes que lhe forem distribuídos;

IV - Submeter pleitos e assuntos para a pauta das reuniões do CONCEA.

Seção III

Da Composição

Art. 9º. O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e constituído por cidadãos brasileiros, com grau acadêmico de doutor ou equivalente, nas áreas de ciências agrárias e biológicas, saúde humana e animal, biotecnologia, bioquímica ou ética, de notória atuação e saber científicos e com destacada atividade profissional nestas áreas, sendo:

I - Um representante de cada um dos seguintes órgãos ou entidades, indicados pelos respectivos titulares:

a) Ministério da Ciência e Tecnologia;
b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq;
c) Ministério da Educação;
d) Ministério do Meio Ambiente;
e) Ministério da Saúde;
f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil - CRUB;
h) Academia Brasileira de Ciências - ABC;
i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC;
j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental - FESBE;
l) Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL, nova denominação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
m) Federação Brasileira de Indústria Farmacêutica - FEBRAFARMA, nova denominação da Federação Nacional da Indústria Farmacêutica.

II - Dois representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

Parágrafo único. Cada membro efetivo terá um suplente, que participará dos trabalhos na ausência do titular.

Art. 10º. No exercício da presidência do CONCEA, o Ministro de Estado de Ciência e Tecnologia será substituído, nos seus impedimentos ou afastamentos, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério e, nos casos dos impedimentos destes, pelo Coordenador do CONCEA.

Parágrafo único. Nos casos em que o Coordenador do CONCEA exercer a presidência do Conselho, o seu suplente terá direito a voto.

Art. 11º. Os representantes de que trata o inciso II do art. 9º serão escolhidos pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, a partir de lista tríplice elaborada por comissão ad hoc, integrada por três membros externos ao CONCEA, constituída

por cidadãos brasileiros, com grau acadêmico de doutor ou equivalente e comprovada experiência profissional de, no mínimo, cinco anos em atividades relacionadas à utilização ética de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica.

Art. 12º. Os representantes de que trata o inciso I do art. 9º, e seus suplentes, serão indicados pelos titulares dos respectivos órgãos no prazo de trinta dias da data da comunicação do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, que os designará em ato próprio.

Art. 13º. A designação de qualquer membro do CONCEA em razão de vacância obedecerá aos mesmos procedimentos da designação ordinária.

Art. 14º. Os membros do CONCEA de que tratam os incisos I e II do art. 9º terão mandato de dois anos, podendo ser renovado na forma do regimento interno.

Parágrafo único. A contagem do período do mandato de membro suplente é contínua, ainda que assuma o mandato de titular.

Art. 15º. As despesas com transporte, alimentação e hospedagem dos membros do CONCEA para participar das reuniões ordinárias ou extraordinárias serão de responsabilidade do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Parágrafo único. Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

Art. 16º. Os membros do CONCEA devem pautar a sua atuação pela observância estrita dos conceitos ético-profissionais, sendo vedado participar do julgamento de questões com as quais tenham envolvimento de ordem profissional ou pessoal, sob pena de perda de mandato.

I - O membro do CONCEA, ao ser empossado, assinará declaração de conduta, explicitando eventual conflito de interesse, na forma do regimento interno.

II - O membro do CONCEA deverá manifestar seu eventual impedimento nos processos a ele distribuídos para análise, quando do seu recebimento, ou, quando não for o relator, no momento das deliberações nas reuniões das câmaras ou do plenário.

III - Poderá arguir o impedimento o membro do CONCEA ou aquele legitimado como interessado, nos termos do art. 9º da Lei nº 9.784, de 29 de janeiro de 1999.

IV - A arguição de impedimento será formalizada em petição fundamentada e devidamente instruída, e será decidida pelo plenário do CONCEA.

V - É nula a decisão técnica tomada com voto de membro impedido.

VI - No caso do § 5º, o plenário do CONCEA proferirá nova decisão, na qual regulará expressamente o objeto da decisão viciada e os efeitos dela decorrentes, desde a sua publicação.

Art. 17º. O CONCEA contará com um Coordenador, que será escolhido e designado pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, entre os membros que o integram, para mandato de dois anos, renovável por igual período.

I - O Coordenador do CONCEA será escolhido a partir de lista tríplice elaborada pelos membros do CONCEA.

II - A lista tríplice para indicação do primeiro Coordenador do CONCEA será elaborada a partir dos votos dos Conselheiros presentes, a serem obtidos na segunda sessão ordinária imediatamente posterior à instalação do Conselho.

III - Para compor a lista tríplice, serão indicados os membros que obtiverem as três maiores pontuações de votos entre os membros presentes do CONCEA.

Art. 18º. O CONCEA constituirá câmaras permanentes nas áreas definidas pelo regimento interno, para análise prévia dos temas a serem submetidos ao plenário, bem como câmaras temporárias quando necessário.

Seção IV

Da Estrutura Administrativa

Art. 19º. O CONCEA contará com uma Secretaria-Executiva, cabendo ao Ministério da Ciência e Tecnologia a ela prestar o apoio técnico e administrativo.

Parágrafo único. O Secretário-Executivo do CONCEA será nomeado pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia.

Art. 20º. Cabe à Secretaria-Executiva do CONCEA, entre outras atribuições a serem definidas no regimento interno:

I - Prestar apoio técnico e administrativo necessários à execução dos trabalhos do CONCEA, inclusive de suas câmaras permanentes e temporárias;

II - Receber, instruir e fazer tramitar os pleitos submetidos à deliberação do CONCEA;

III - Encaminhar as deliberações do CONCEA aos órgãos governamentais responsáveis pela sua implementação e providenciar a devida publicidade;

IV - Atualizar e promover os credenciamentos dos institutos no CIUCA, de acordo com as normas e determinações do CONCEA;

V - Implementar as deliberações do CONCEA;

VI - Promover a instrução e a tramitação dos processos a serem submetidos à deliberação do CONCEA;

VII - Dar suporte às instituições credenciadas;

VIII - Emitir, de acordo com deliberação do CONCEA e em nome deste Conselho, comprovante de registro atualizado de credenciamento;

IX - Administrar o cadastro das instituições e dos protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e de pesquisa científica, assim como dos pesquisadores, de que trata o inciso VII do art. 4º;

X - Analisar as solicitações de credenciamento, emitindo nota técnica para apreciação do CONCEA ou de suas câmaras permanentes ou temporárias;

XI - Conceder as licenças, de acordo com as estipulações previstas em portaria do Ministério da Ciência e Tecnologia, para as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino, à pesquisa científica de que trata o art. 11 da Lei nº 11.794, de 2008, observadas as normas do CONCEA;

XII - Dar publicidade aos atos do CONCEA, na forma do regimento interno; e

XIII - Publicar as licenças concedidas.

Art. 21º. O funcionamento e a organização da Secretaria-Executiva do CONCEA serão definidos no regimento interno.

Seção V

Das Reuniões e Deliberações

Art. 22º. O membro suplente terá direito a voz e, na ausência do respectivo titular, a voto nas deliberações.

Art. 23º. As deliberações do plenário do CONCEA só poderão ocorrer com a presença mínima de oito membros votantes.

Parágrafo único. As decisões do CONCEA serão tomadas com votos favoráveis da maioria absoluta dos membros presentes, salvo as hipóteses específicas previstas neste Decreto.

Art. 24º. Perderá seu mandato o membro que:

I - Violar o disposto no art. 16;

II - Não comparecer a três reuniões ordinárias consecutivas do plenário do CONCEA, sem justificativa.

Art. 25º. O CONCEA reunir-se-á, em caráter ordinário, uma vez a cada trimestre e, extraordinariamente, a qualquer momento, mediante convocação de seu Presidente ou por solicitação fundamentada subscrita pela maioria absoluta dos seus membros.

Parágrafo único. A periodicidade das reuniões ordinárias poderá, em caráter excepcional, ser alterada por deliberação do CONCEA.

Art. 26º. Os órgãos e entidades integrantes da administração pública federal poderão solicitar participação em reuniões do CONCEA para tratar de assuntos de seu especial interesse, sem direito a voto.

Parágrafo único. A solicitação à Secretaria-Executiva do CONCEA deverá ser acompanhada de justificação que demonstre a motivação do pedido, para posterior submissão e deliberação do Conselho.

Art. 27º. Poderão ser convidados a participar das reuniões, em caráter excepcional, representantes da comunidade científica, do setor público e de entidades da sociedade civil, sem direito a voto.

Art. 28º. Das deliberações das CEUAs e da Secretaria-Executiva do CONCEA cabe recurso ao CONCEA, cuja decisão será tomada pela maioria absoluta de seus membros.

Art. 29º. Poderá solicitar o credenciamento de que trata o inciso II do art. 4º, a

instituição de natureza pública ou privada que atenda aos seguintes requisitos, entre outros que poderão ser exigidos pelo CONCEA:

I - Comprovação de que tenha sido constituída sob as leis brasileiras;

II - Apresente comprovada qualificação técnica para o desempenho de atividades de que trata a Lei nº 11.794, de 2008; e

III - Comprove ter disponível estrutura física adequada e pessoal qualificado para o manuseio, ensino e pesquisa científica com a utilização ou criação de animais.

Seção VI

Da Tramitação dos Recursos e Processos

Art. 30º. Os requerimentos de credenciamento das instituições no CONCEA serão encaminhados à sua Secretaria-Executiva, sendo seu procedimento definido pelo Conselho.

Art. 31º. Os demais processos e recursos submetidos ao CONCEA obedecerão ao trâmite definido nesta Seção.

Art. 32º. O requerimento será protocolado na Secretaria-Executiva do CONCEA, autuado e devidamente instruído.

Art. 33º. O processo será distribuído, por sorteio, a um dos membros de determinada câmara, para relatoria e elaboração de parecer.

Art. 34º. O parecer será submetido a uma ou mais câmaras permanentes ou temporárias para formação e aprovação do parecer final.

Art. 35º. O parecer final, após sua aprovação nas câmaras permanentes ou temporárias para as quais o processo foi distribuído, será encaminhado ao plenário do CONCEA para deliberação.

Art. 36º. O voto vencido de membro de câmara permanente ou temporária deverá ser apresentado de forma expressa e fundamentada e será consignado como voto divergente no parecer final para apreciação e deliberação do plenário.

Art. 37º. Os processos para apuração de infração administrativa seguirão o rito deste artigo.

I - Após autuado e instruído pela Secretaria-Executiva do CONCEA, o processo será distribuído, por sorteio, a um relator, que abrirá prazo de vinte dias para defesa do representado.

II - Decorrido o prazo previsto no § 1º, com ou sem manifestação do representado, o relator poderá requerer novas diligências à Secretaria-Executiva do CONCEA e, após, remeter os autos à Consultoria Jurídica do Ministério da Ciência e Tecnologia, para parecer.

III - Após o parecer da Consultoria Jurídica, o relator abrirá prazo de vinte dias para alegações finais do representado.

IV - Decorrido o prazo previsto no § 3º, com ou sem manifestação do representado, o relator apresentará o processo, em até vinte dias, para inclusão na pauta da próxima reunião do Plenário.

V - A decisão pela aplicação das sanções previstas nos arts. 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 2008, só poderá ser tomada com o voto favorável da maioria absoluta dos membros do CONCEA.

Art. 38º. O CONCEA adotará as providências necessárias para resguardar as informações sigilosas, de interesse comercial, apontadas pelo proponente e assim consideradas pelo Conselho, desde que sobre essas informações não recaiam interesses particulares ou coletivos constitucionalmente garantidos.

I - A fim de que seja resguardado o sigilo a que se refere o caput, o requerente deverá dirigir ao Presidente do CONCEA solicitação expressa e fundamentada, contendo a especificação das informações cujo sigilo pretende resguardar.

II - O pedido será decidido por despacho fundamentado, contra o qual caberá recurso ao plenário, em procedimento a ser estabelecido no regimento interno do CONCEA, garantido o sigilo requerido até decisão final em contrário.

III - O requerente poderá optar por desistir do pleito, caso tenha seu pedido de sigilo indeferido definitivamente, hipótese em que será vedado ao CONCEA dar publicidade à informação objeto do pretendido sigilo.

Art. 39º. Os órgãos e entidades de registro e fiscalização requisitarão acesso a determinada informação sigilosa, desde que indispensável ao exercício de suas funções, em petição que fundamentará o pedido e indicará o agente que a ela terá acesso.

Art. 40º. Os demais casos não previstos neste Capítulo serão definidos pelo regimento interno do CONCEA.

CAPÍTULO III

DO CADASTRO DAS INSTITUIÇÕES DE USO CIENTÍFICO DE ANIMAIS - CIUCA

Art. 41º. Fica criado o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, a ser implementado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e administrado pela Secretaria-Executiva do CONCEA, conforme normas expedidas por aquele Ministério, e destinado ao registro:

I - Das instituições para criação ou utilização de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II - Dos protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas CEUAs; e

III - Das solicitações de credenciamento no CONCEA.

Art. 42º. A instituição de direito público ou privado que pretender realizar pesquisa científica ou apenas desenvolvimento tecnológico, em laboratórios de experimentação animal, o que engloba, no âmbito experimental, a construção e manutenção de laboratórios ou biotérios, a manipulação, o transporte, a transferência, o armazenamento, eutanásia, ou qualquer uso de animais com finalidade didática, de pesquisa científica ou desenvolvimento tecnológico, deverá requerer junto ao CONCEA o seu credenciamento.

Parágrafo único. O CONCEA estabelecerá os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do credenciamento.

CAPÍTULO IV

DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUAs

Art. 43º. As CEUAs deverão ser compostas por membros titulares e respectivos suplentes, designados pelos representantes legais das instituições, e serão constituídas por cidadãos brasileiros de reconhecida competência técnica e notório saber, de nível superior, graduado ou pós-graduado, e com destacada atividade profissional em áreas relacionadas ao escopo da Lei nº 11.794, de 2008.

Art. 44º. Compete às CEUAs, no âmbito das instituições onde constituídas:

I - Cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto na Lei nº 11.794, de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II - Examinar previamente os protocolos experimentais ou pedagógicos aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III - Manter cadastro atualizado dos protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV - Manter cadastro dos pesquisadores e docentes que desenvolvam protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica, enviando cópia ao CONCEA;

V - Expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos, CONCEA ou outras entidades ligadas ao objeto deste Decreto;

VI - Notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras;

VII - Estabelecer programas preventivos e de inspeção para garantir o funcionamento e a adequação das instalações sob sua responsabilidade, dentro dos padrões e normas definidas pelo CONCEA;

VIII - Manter registro do acompanhamento individual de cada atividade ou projeto em desenvolvimento que envolva ensino ou pesquisa científica realizados, ou em andamento, na instituição, e dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa científica; e

I - Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições da Lei nº 11.794, de 2008, na execução de atividade de ensino ou pesquisa científica, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

II - Quando se configurar a hipótese prevista no § 1º, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 a 20 da Lei nº 11.794, de 2008.

III - Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

IV - Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas ou ao desenvolvimento de protocolos relacionados à pesquisa científica em andamento.

V - Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

Art. 45º. Os demais casos não previstos neste Capítulo serão definidos pelo regimento interno do CONCEA.

CAPÍTULO V

DAS INFRAÇÕES ADMINISTRATIVAS

Art. 46º. Considera-se infração administrativa toda ação ou omissão, de pessoa física ou jurídica, que viole as normas previstas na Lei nº 11.794, de 2008, neste Decreto e demais disposições legais pertinentes, em especial:

I - Criar ou utilizar animais em atividades de ensino e pesquisa científica como pessoa física em atuação autônoma;

II - Criar ou utilizar animais em atividades de ensino e pesquisa científica sem estar credenciado no CONCEA ou em desacordo com as normas por ele expedidas;

III - Deixar de oferecer cuidados especiais aos animais antes, durante e após as intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado, conforme estabelecido pelo CONCEA;

IV - Deixar de submeter o animal a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento, ressalvada a hipótese do § 2º do art. 14 da Lei nº 11.794, de 2008;

V - Realizar experimentos que possam causar dor ou angústia sem sedação, analgesia ou anestesia adequadas, ressalvada a hipótese do inciso VI;

VI - Realizar experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia sem autorização específica da CEUA;

VII - Utilizar bloqueadores neuromusculares ou relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas;

VIII - Reutilizar o mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa;

IX - Realizar trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados em desacordo com as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula;

X - Realizar, em programa de ensino, vários procedimentos traumáticos num mesmo animal, sem que todos os procedimentos sejam executados durante os efeitos de um único anestésico ou sem que o animal seja sacrificado antes de recobrar o sentido;

XI - Realizar pesquisa científica ou atividade de ensino reguladas por este Decreto sem supervisão de profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, conforme norma do CONCEA, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa por ele credenciada;

XII - Exercer as atividades previstas no art. 11 da Lei nº 11.794, de 2008, sem a competente licença do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 47º. Qualquer pessoa, constatando a ocorrência de infração administrativa prevista neste Decreto, poderá dirigir representação ao órgão ou entidade de fiscalização competente, para efeito do exercício de poder de polícia.

Art. 48º. São competentes para lavrar auto de infração e remetê-lo ao CONCEA, os órgãos de fiscalização dos Ministérios previstos no art. 21 da Lei nº 11.794, de 2008, nas respectivas áreas de competências, sem prejuízo das atribuições das CEUAs.

Parágrafo único. Quando a infração puder configurar crime ou contravenção, ou lesão à Fazenda Pública ou ao consumidor, a autoridade fiscalizadora, além da obrigação do caput, representará junto ao órgão competente para apuração das responsabilidades administrativa e penal.

CAPÍTULO VI

DAS SANÇÕES ADMINISTRATIVAS

Art. 49º. As infrações administrativas, independentemente das medidas cautelares cabíveis, serão punidas com as seguintes sanções:

I - Aplicáveis a pessoas jurídicas:

a) advertência;

b) multa de R$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R$ 20.000,00 (vinte mil reais);

c) interdição temporária;

d) suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

e) interdição definitiva.

II - Aplicáveis a pessoas físicas:

a) advertência;

b) multa de R$ 1.000,00 (mil reais) a R$ 5.000,00 (cinco mil reais);

c) suspenção temporária;

d) interdição definitiva para o exercício da atividade regulada pela Lei nº 11.794, de 2008.

Art. 50º. Para a imposição da pena e sua gradação, o CONCEA levará em conta:

I - A gravidade da infração;

II - Os antecedentes do infrator quanto ao cumprimento da Lei nº 11.794, de 2008, deste Decreto e das normas expedidas pelo CONCEA;

III - As circunstâncias agravantes;

IV - As circunstâncias atenuantes;

V - Os danos advindos da infração.

Parágrafo único. Para o efeito do inciso I do caput, as infrações previstas neste Decreto serão classificadas em leves, graves e gravíssimas, segundo os seguintes critérios:

I - O grau de sofrimento gerado no animal;

II - Os meios utilizados para consecução da infração;

III - As conseqüências, efetivas ou potenciais, para a saúde animal;

IV - A culpabilidade do infrator.

Art. 51º. A advertência será aplicada somente nas infrações de natureza leve.

Art. 52º. A multa será aplicada obedecendo a seguinte gradação:

I - Para pessoas jurídicas:

a) de R$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R$ 10.000,00 (dez mil reais) nas infrações de natureza leve;

b) de R$ 10.001,00 (dez mil e um reais) a R$ 15.000,00 (quinze mil reais) nas infrações de natureza grave;

c) de R$ 15.001,00 (quinze mil e um reais) a R$ 20.000,00 (vinte mil reais) nas infrações de natureza gravíssima;

II - Para pessoas físicas:

a) de R$ 1.000,00 (mil reais) a R$ 2.000,00 (dois mil reais) nas infrações de natureza leve;

b) de R$ 2.001,00 (dois mil e um reais) a R$ 4.000,00 (quatro mil reais) nas infrações de natureza grave;

c) de R$ 4.001,00 (quatro mil e um reais) a R$ 5.000,00 (cinco mil reais) nas infrações de natureza gravíssima.

III - As multas poderão ser aplicadas cumulativamente com as demais sanções previstas neste Decreto.

Art. 53º. Os recursos arrecadados com a aplicação de multas serão destinados ao CONCEA, para promoção e incentivo da utilização ética de animais em atividades de ensino e pesquisa científica.

Art. 54º. Os órgãos e entidades fiscalizadores da administração pública federal poderão celebrar convênios com os Estados, Distrito Federal e Municípios, para a execução de serviços relacionados à atividade de fiscalização prevista neste Decreto.

Art. 55º. As sanções previstas nas alíneas “c” e “d” do inciso I e na alínea “c” do inciso II do art. 49 serão aplicadas somente nas infrações de natureza grave ou gravíssima.

Art. 56º. As sanções previstas na alínea “e” do inciso I e na alínea “d” do inciso II do art. 49 serão aplicadas somente nas infrações de natureza gravíssima.

Art. 57º. Se o infrator cometer, simultaneamente, duas ou mais infrações, ser-lhe-ão aplicadas, cumulativamente, as sanções cominadas a cada uma delas.

CAPÍTULO VII

DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 58º. Em casos de interesse ou calamidade pública, assim declarado em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, poderão ser dispensadas exigências previstas neste Decreto.

Parágrafo único. Para os efeitos deste Decreto, considera-se interesse público os fatos relacionados à saúde pública, à nutrição, à defesa do meio ambiente, bem como aqueles de primordial importância para o desenvolvimento tecnológico ou socioeconômico do País.

Art. 59º. O CONCEA, no prazo de até noventa dias de sua instalação, definirá proposta para seu regimento interno, a ser submetida à aprovação do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia.

Art. 60º. O credenciamento e o licenciamento de que tratam o inciso II do art. 5º e o art. 11 da Lei nº 11.794, de 2008, respectivamente, só serão exigíveis após a sua implementação pelos órgãos competentes.

Art. 61º. Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Brasília, 15 de julho de 2009; 188º da Independência e 121º da República.
LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA
Sergio Machado Rezende
Este texto não substitui o publicado no DOU de 16.7.2009

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 3 DE JULHO DE 2014

Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências.

O CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 5º, inciso III, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, resolve: CAPÍTULO I

DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º. Esta Resolução Normativa dispõe sobre o reconhecimento no país de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa, nos termos do inciso III do art. 5 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e sua regulamentação.

Art. 2º. Para os efeitos desta Resolução Normativa, considera-se:

- *Método Alternativo:* qualquer método que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de pesquisa;

- *Método Alternativo validado:* método cuja confiabilidade e relevância para determinado propósito foram determinadas por meio de um processo que envolve os estágios de desenvolvimento, prévalidação, validação e revisão por especialistas, o qual está em conformidade com os procedimentos realizados por Centros para Validação de Métodos Alternativos ou por estudos colaborativos internacionais, podendo ter aceitação regulatória internacional;

- *Método Alternativo Reconhecido:* é o método alternativo validado que foi reconhecido pelo CONCEA. CAPÍTULO II

DA VALIDAÇÃO E RECONHECIMENTO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE PESQUISA

Art. 3º. As instituições interessadas em validar métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa deverão estar associadas à Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), criada por meio da Portaria nº 491, de 03 de julho de 2012, do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Art. 4º. O CONCEA poderá reconhecer o método alternativo validado por Centros para Validação ou por estudos colaborativos internacionais publicados em compêndios oficiais.

Art. 5º. O reconhecimento do método alternativo validado ocorrerá por deliberação plenária do CONCEA, considerando o parecer da Câmara de Métodos Alternativos, ouvidos os órgãos oficiais pertinentes.

Parágrafo único. Após o reconhecimento pelo CONCEA do método alternativo, fica estabelecido o prazo de até 5 (cinco) anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo.

CAPÍTULO VIII

DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 6º. O CONCEA publicará no Diário Oficial da União e manterá em seu sítio eletrônico a lista de métodos alternativos reconhecidos.

Art. 7º. O CONCEA decidirá sobre as situações não previstas nesta Resolução Normativa.

Art. 8º. Esta Resolução Normativa entra em vigor na data de sua publicação no Diário Oficial da União.

CLELIO CAMPOLIMA DINIZ (D.O.U. de 04/07/2014, Seção I, Pág. 51.)

Presidente do Conselho

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

GABINETE DO MINISTRO

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014

Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências.

O CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 5º, inciso III, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, resolve:

Art. 1º. Esta Resolução Normativa reconhece o uso no país de métodos alternativos validados, que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa, nos termos do inciso III do art. 5º da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, e sua regulamentação.

Art. 2º. Para os efeitos desta Resolução Normativa, o CONCEA reconhece os 17 (dezessete) métodos alternativos agrupados nos 07 (sete) desfechos a seguir:

- Para avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele:

Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica *in vitro:* Teste de Resistência Elétrica Transcutânea;

Método OECD TG 431 - Corrosão Dérmica *in vitro*: Teste da Epiderme Humana Reconstituída;

Método OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana *in vitro*; e

Método OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea *in vitro*.

- Para avaliação do potencial de Irritação e corrosão ocular:

Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina;

Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha; e

Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína.

- Para avaliação do potencial de Fototoxicidade:

Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.

IV - Para avaliação da absorção cutânea:

Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método *in vitro*.

- Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea:

a) Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea:

Ensaio do Linfonodo Local; e Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local.

- Para avaliação de toxicidade aguda:

Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas;

Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda;

Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento “Up and Down”; e

Método OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica.

- Para avaliação de genotoxicidade:

Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro.*

Art. 3º. As aplicações específicas de cada um dos métodos previstos no art. 2º desta Resolução Normativa, bem como a determinação de se destinarem à substituição total, à substituição parcial ou à redução, encontram-se descritas no próprio método e, como tal, devem ser respeitadas.

Art. 4º. Os métodos alternativos descritos no art. 2º desta Resolução Normativa encontram-se formalmente validados por centros internacionais de validação, seguindo a Diretriz 34 da OECD, e possuem aceitação regulatória internacional.

Parágrafo único. Com o reconhecimento dos métodos alternativos descritos no art. 2º desta Resolução Normativa, fica estabelecido o prazo de até 05 (cinco) anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo.

Art. 5º. Esta Resolução Normativa entra em vigor na data de sua publicação no Diário Oficial da União. CLELIO CAMPOLINA DINIZ (D.O.U. de 25/09/2014, Seção I, Pág. 9.)

Nota Explicativa do CONCEA sobre a Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014.

O CONCEA, criado pela Lei nº 11.794, de 2008, e regulamentado pelo Decreto nº 6.899, de 2009, é a autoridade nacional responsável por formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino ou pesquisa científica, tendo o dever de definir os critérios, limites e definições estabelecidas por aquela Lei.

A Resolução Normativa nº 17, publicada em 3 de julho de 2014, suprindo a ausência da definição na Lei nº 11.794 de 2008 do que seriam Métodos Alternativos, em seu artigo 2º considera:

– *Método Alternativo:* qualquer método que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de pesquisa;

– *Método Alternativo Validado:* método cuja confiabilidade e relevância para determinado propósito foram determinadas por meio de processo que envolve estágios de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão por especialistas, em conformidade com os procedimentos realizados por Centros para Validação

de Métodos Alternativos ou por estudos colaborativos internacionais, podendo ter aceitação regulatória internacional; e

Método Alternativo Reconhecido: é o método alternativo validado que foi reconhecido pelo CONCEA.

Em outras palavras, no entendimento do CONCEA, que considera o princípio dos 3R's e observa o art 2º do Decreto nº 6.899/2009, constitui-se método alternativo procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que utilizem animais; usem animais de diferentes Ordens; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos ex-vivos; ou, ao menos, diminuam ou eliminem o desconforto.

Contudo, é importante enfatizar que a validação de métodos alternativos é restrita aos testes utilizados em pesquisa científica, não existindo processo de validação para métodos alternativos para ensino.

Como um todo, a Resolução Normativa nº 17/2014 foi elaborada reforçando a primeira preocupação do CONCEA, que é o bem-estar animal e cujas ações visam assegurar a dignidade e o respeito à vida. Dessa forma a Resolução Normativa nº 17/2014 vai além de se dedicar à substituição total dos métodos que utilizam animais sencientes. Sua redação procura contemplar a perspectiva dos 3R's, indicando que Métodos Alternativos podem, além de substituir, reduzir ou refinar a utilização de animais sencientes, sem contudo, relevar a necessidade ética da segurança da avaliação de produtos, tais como novos medicamentos e vacinas ou diagnóstico e controle de doenças infecciosas para todas as espécies animais.

Assim, além de definir o que é método alternativo validado, a Resolução Normativa nº 17/2014 estabelece que a partir do seu reconhecimento pelo CONCEA, seja dado um prazo máximo de 5 anos para que seu uso seja obrigatório em todo o território brasileiro. Esse período é importante para que toda a cadeia produtiva, isto é, capacitação técnica de pessoal, adequação de processos e equipamentos, que dependa das avaliações obtidas por esses métodos, possa se adaptar corretamente, sem comprometer, inclusive, a confiança nos métodos reconhecidos pelo CONCEA.

Tendo em vista duas representações contrárias à Resolução Normativa nº 17/2014, alegando que a definição de métodos alternativos, engloba além da substituição, redução ou refinamento no uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, quando, no entender das Procuradorias, método alternativo seria apenas aquele que leva à substituição de animais, a Consultoria Jurídica do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI elaborou o parecer explicativo nº 838/2014/CONJUR-MCTI/CGU/AGU/ffs. Esse parecer conclui, de maneira muito bem fundamentada, sobre a legalidade e constitucionalidade da Resolução Normativa nº 17/2014, reforçando que consiste em um importante instrumento para a introdução, validação e implementação de métodos alternativos ao uso de animais em atividade de ensino ou de pesquisa científica no País.

O parecer esclarece que não há, como afirmado pelo Ministério Público, uma autorização aos laboratórios a cometerem crime por maus-tratos, uma vez que as atividades dos referidos laboratórios são monitoradas pelo CONCEA e devem seguir os preceitos preconizados pela Lei nº 11.794/2008.

O parecer esclarece que o CONCEA não está atuando no sentido oposto ao desejado pela sociedade e preconizado pela legislação, mas sim permitindo que haja, de forma segura, uma significativa redução do número de animais utilizados, e que gradativamente, à medida em que ocorre o avanço da ciência e tecnologia, resulte na sua substituição.

Exemplificando, um teste alternativo validado e reconhecido permite reduzir o número de animais. Além disso, amostras de tecidos, células isoladas ou órgãos retirados de carcaças destinadas à alimentação obtidos em abatedouros ou frigoríficos podem ser utilizados nesses protocolos. Reitera-se que a validação e o reconhecimento dos métodos alternativos garante a segurança exigida pelas agências governamentais responsáveis pela disponibilização dos produtos testados à população.

Dessa forma, o parecer conclui manifestando-se pela legalidade e constitucionalidade da Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014.

Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 18 DE AGOSTO DE 2016

Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil.

O CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 5º, inciso III, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, resolve:

Art. 1º. Esta Resolução Normativa reconhece o uso no país de métodos alternativos validados, que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa, nos termos do inciso III, do art. 5º, da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, e sua regulamentação.

Art. 2º. Para os efeitos desta Resolução Normativa, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA reconhece os 7 (sete) métodos alternativos agrupados nos 4 (quatro) desfechos a seguir:

I - Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:

a) Método OECD TG 491 - Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares;

b) Método OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído;

II - Avaliação do potencial de sensibilização cutânea:

Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea *in chemico*;

Método OECD TG 442D - Sensibilização cutânea *in vitro*;

III - avaliação de toxicidade reprodutiva:

Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento;

Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva; e

IV - Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:

a) Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira).

Art. 3º As aplicações específicas de cada um dos métodos previstos no art. 2º desta Resolução Normativa, bem como a determinação de se destinarem à substituição total, à substituição parcial ou à redução, encontram-se descritas no próprio método e, como tal, devem ser respeitadas.

Art. 4º Os métodos alternativos descritos no art. 2º desta Resolução Normativa encontram-se formalmente validados por centros internacionais de validação, seguindo o Guia 34 da OECD, e possuem aceitação regulatória internacional.

Parágrafo único. Com o reconhecimento dos métodos alternativos descritos no art. 2º desta Resolução Normativa, fica estabelecido o prazo de até 05 (cinco) anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo.

Art. 5º Esta Resolução Normativa entra em vigor na data de sua publicação no Diário Oficial da União. GILBERTO KASSAB (DOU de 19/08/2016, Seção I, Pág.04

Ministério da Saúde - MS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC N° 35, DE 7 DE AGOSTO DE 2015

(Publicada no DOU nº 151, de 10 de agosto de 2015)

Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe conferem os incisos III e IV, do art. 15, da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, inciso V e §§ 1º e 3º do art. 58 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 29, de 21 de julho de 2015, publicada no D.O.U de 23 de julho de 2015, tendo em vista o

disposto nos incisos III, do art. 2º, III e IV, do art. 7º da Lei nº 9.782, de 1999, e o Programa de Melhoria do Processo de Regulamentação da Agência, instituído por Portaria nº 422, de 16 de abril de 2008, em Reunião Ordinária Pública – ROP 014, realizada em 30 de julho de 2015, adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Esta Resolução dispõe sobre a aceitação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos no Brasil pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Concea, que objetivam a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa, nos termos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e sua regulamentação.

Art. 2º Nas petições submetidas à análise pela Anvisa são aceitos os métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa reconhecidos pelo Concea, nos termos da Resolução Normativa Nº 17, de 03 de julho de 2014.

Parágrafo único. Excetuam-se do previsto no caput deste artigo os casos específicos em que a Anvisa, mediante justificativa técnica devidamente fundamentada, apresente a inadequação e inaplicabilidade dos métodos reconhecidos pelo Concea.

Art. 3º As regras previstas no Art. 2º aplicam-se também às petições pendentes de análise na data de publicação desta Resolução no Diário Oficial da União.

Art. 4º Esta Resolução entra em vigor na data da sua publicação no Diário Oficial da União.

JARBAS BARBOSA DA SILVA JR.

DIRETOR-PRESIDENTE

Adotado: 28 de julho de 2015

Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430

Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (TER)

INTRODUÇÃO

1. A corrosão cutânea refere-se à produção de danos irreversíveis na pele que se manifestam como necrose visível através da epiderme e na derme, após a aplicação de uma substância química de teste [definido pelo Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem das Nações Unidas (ONU) de substâncias químicas (GHS)][1]. Esta Diretriz 430 atualizada fornece um procedimento *in vitro* que permite a identificação de substâncias e misturas não-corrosivas e corrosivas de acordo com o GHS da ONU[(1)].

2. A avaliação da corrosividade da pele envolve normalmente a utilização de animais de laboratório (OECD Diretriz 404 foi originalmente adotada em 1981 e revista em 1992, 2002 e 2015)[(2)]. Além da atual Diretriz 430, outros métodos de testes *in vitro* para testar o potencial de corrosão da pele de substâncias químicas foram validados e adotados como Diretriz 431[(3)] e 435[(4)] da OECD, que também são capazes de identificar subcategorias de substâncias químicas corrosivas, se necessário. Diversos métodos validados de testes *in vitro* foram adotados como OECD Diretriz 439[(5)], para serem usados no teste de irritação cutânea. Um documento sobre Abordagens Integradas de Testes e Avaliação (AITA) para corrosão e irritação da pele descreve vários módulos que agrupam diversas fontes de informação e ferramentas de análise, fornecendo orientação sobre: (i) como integrar e usar dados de teste e não-teste existentes para avaliação da irritação da pele e potenciais de corrosão cutânea de substâncias químicas e (ii) propõe uma abordagem quando são necessários mais testes[(6)].

3. Esta diretriz aborda a corrosão terminal da pele na saúde humana. Baseia-se no método de teste de resistência elétrica transcutânea da pele do rato (TER), que utiliza discos de pele para identificar produtos corrosivos pela sua capacidade de produzir uma perda de integridade da camada córnea normal e função de barreira. Esta diretriz foi originalmente adotada em 2004 e atualizada em 2015 para se referir ao documento de orientação da AITA.

4. Para avaliar o teste de corrosão cutânea *in vitro* para fins regulatórios, foram conduzidos estudos de pré-validação[7], seguido de um estudo formal de validação do método TER de pele de rato para avaliar a corrosão da pele[8-11]. O resultado desses estudos levou à recomendação de que o método de teste TER (denominado Método de Referência Validado - VRM) poderia ser usado para fins regulatórios para a avaliação da corrosividade cutânea *in vivo*[12-14].

5. Antes que, para fins regulatórios, se possa usar um método de teste *in vitro* TER, similar ou modificado, para corrosão cutânea diferente do VRM, devem ser determinadas sua confiabilidade, relevância (precisão) e limitações para o uso proposto para assegurar sua similaridade com o VRM, de acordo com os requisitos dos Padrões de Desempenho[15]. A Aceitação Mútua de Dados somente será garantida depois que qualquer método de teste, novo ou atualizado, tenha sido revisado e incluído seguindo o PS do Guia ter sido revisado e incluído nesta diretriz.

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Um estudo de validação[10] e outros estudos publicados[16,17] relataram que o método de teste TER da pele de rato é capaz de diferenciar corrosivos cutâneo-conhecidos e não-corrosivos, com uma sensibilidade global de 94% (51/54) e especificidade de 71% (48/68) para uma base de dados de 122 substâncias.

8. Esta diretriz de teste aborda a corrosão cutânea *in vitro*. Permite a identificação de substâncias químicas de teste não-corrosivos e corrosivos de acordo com o GHS da ONU[1]. Uma limitação desta diretriz, como demonstrado pelos estudos de validação[8-11], é que ela não permite a subcategorização de substâncias corrosivas e misturas de acordo com o GHS da ONU[1]. O marco regulatório nos países membros decidirá como esta diretriz será usada. Embora esta diretriz não forneça informações adequadas sobre a irritação cutânea, deve ser notado que a OECD Diretriz 439 aborda especificamente o efeito sobre a saúde da irritação da pele *in vitro*[5]. Para uma avaliação completa dos efeitos locais da pele após uma

única exposição dérmica, deve ser consultado o Documento de Orientação nº 203 sobre Abordagens Integradas para Testes de Avaliação[6].

9. Uma vasta gama de substâncias químicas, que representam principalmente substâncias, foi testada na validação subjacente a esta diretriz e a base de dados empírica do estudo de validação totalizou 60 substâncias, abrangendo uma ampla gama de classes de substâncias químicas[8,9]. Com base nos dados gerais disponíveis a Diretriz é aplicável a uma diversa gama de classes químicas e estados físicos, incluindo líquidos, semi-sólidos, sólidos e ceras. Todavia, uma vez que para alguns estados físicos específicos dados de referência adequados não estão disponíveis, deve-se ter em mente que um número pequeno de ceras e sólidos corrosivos foi avaliado durante a validação. Os líquidos podem ser aquosos ou não aquosos; os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Nos casos em que possam ser demonstradas provas da não aplicabilidade da Diretriz a uma categoria específica de substâncias a Diretriz não deve ser utilizada para essa categoria. Além disso, presume-se que esta diretriz seja aplicável a misturas como uma extensão de sua aplicabilidade a substâncias. No entanto, devido ao fato de as misturas abrangerem um amplo espectro de categorias e composição, e que atualmente apenas estão disponíveis informações limitadas sobre o teste de misturas, não se deve usar a Diretriz nos casos em que podem ser demonstradas provas da não aplicabilidade desta diretriz àquela categoria específica de misturas (seguindo uma estratégia como proposta por Eskes *et al.*, 2012, por exemplo)[18]. Antes de usar a Diretriz em uma mistura para gerar dados com finalidade regulatória, deve-se considerar se, e por quais razões, ela pode fornecer resultados adequados para essa finalidade. Tais considerações não são necessárias quando há uma exigência regulamentar para o teste da mistura. Gases e aerossóis ainda não foram avaliados em estudos de validação[8,9]. Embora seja concebível que possam ser testados usando o método de teste TER, o Guia de Teste atual não permite testes de gases e aerossóis.

PRINCÍPIO DO TESTE

10. A substância química em estudo é aplicada durante 24 horas nas superfícies epidérmicas dos discos de pele, num sistema de teste de dois compartimentos, no qual os discos de pele funcionam como a separação entre os compartimentos. Os discos de pele são retirados de ratos eutanasiados, com idades entre 28 e 30 dias. As substâncias químicas corrosivas são identificados por sua capacidade de produzir uma perda da integridade e função de barreira do estrato córneo normal, que é medida como uma redução no TER abaixo de um limiar[16] (ver parágrafo 32).

Para o TER da pele de rato, um valor de corte de 5kΩ foi selecionado com base em dados extensivos para uma ampla gama de substâncias, onde a grande maioria dos valores estava claramente bem acima (frequentemente >10kΩ), ou bem abaixo (frequentemente <3kΩ) deste valor[16]. Geralmente, as substâncias químicas de teste que não são corrosivas em animais, mas são irritantes ou não irritantes, não reduzem o TER abaixo deste valor de corte. Além disso, o uso de outras preparações para a pele ou outros equipamentos pode alterar o valor de corte, necessitando de validação adicional.

11. Um passo de ligação de corante é incorporado no procedimento de teste para testes de confirmação de resultados positivos no TER, incluindo valores em torno de 5kΩ. A etapa de ligação do corante determina se o aumento da permeabilidade iônica é devido à destruição física do estrato córneo. O método TER utilizando pele de rato mostrou ser preditivo de corrosividade *in vivo* no coelho avaliado sob a Diretriz 404[2] da OECD.

DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA

12. Antes do uso rotineiro do método de teste TER de pele de rato que atende a esta Diretriz, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, classificando corretamente as doze Substâncias de Proficiência recomendadas na tabela 1. Em situações onde uma substância listada não está disponível ou quando justificável, pode ser usada outra substância para a qual estejam disponíveis dados de referência *in vivo* e *in vitro* adequados (por exemplo, da lista de substâncias químicas de referência[16]), desde que sejam aplicados os mesmos critérios de seleção descritos na tabela 1.

Tabela 1: Lista de substâncias de proficiência

Substância	***CARSRN***	***Classe Química[2]***	***Cat. UN GHS baseada em resultados in vitro[3]***	***Cat. VRM baseada em resultados in vitro***	***Estado físico***	***pH[4]***
	Corrosivos in vivo					
N, N-Dimetil dipropilenotriamina	10563-29-8	Base orgânica	1A	6XC	L	8.3
1,2-diaminopropano	78-90-0	Base orgânica	1A	6XC	L	8.3
Ácido sulfúrico a 10%	7664-93-9	Ácido inorgânico	(1A) 1B/ 1C	5xC 1xNC	L	1.2
Hidróxido de potássio (10% aq)	1310-58-3	Ácido inorgânico	(1A) 1B/ 1C	6XC	L	13.2
Ácido Octanoico (Caprílico)	124-07-2	Base orgânica	1B/ 1C	6XC	L	3.6
2-tert-butilfenol	88-18-6	Fenol	1B/ 1C	4xC 2xNC	L	3.9
	Não-corrosivos *in vivo*					
Ácio isoesteárico	2724-58-5	Ácido orgânico	NC	6xNC	L	3.6
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Base orgânica	NC	6xNC	S	5.5
Brometo de fenetilo	103-63-9	Eletrófilo	NC	6xNC	L	3.6
4- (Metiltio) - benzaldeído	3446-89-7	Eletrófilo	NC	6xNC	L	6.8
1,9-decadiene	1647-16-1	Orgânico neutro	NC	6xNC	L	3.9
2-tert-butilfenol	127-18-4	Orgânico neutro	NC	6xNC	L	4.5

Abreviaturas: aq = aquoso; CASRN = Número do Registro do Chemical Abstracts Service; UN GHS = Sistema Global de Harmonização das Nações Unidas[(1)]; VRM = Método de Referência Validado; ND = não determinado.

[1] As substâncias de proficiência, classificadas primeiro por corrosivas *versus não corrosivas*, depois por subcategoria corrosiva e depois por classe química, foram selecionadas das substâncias utilizadas no estudo de validação do ECVAM do método de teste TER em pele de rato[(8,9)]. Salvo indicação em contrário, as substâncias foram testadas no nível de pureza obtido quando compradas de uma fonte comercial[(8)]. A seleção incluiu, na medida do possível, substâncias que: (i) são representativas da gama de respostas de corrosividade (não-corrosivas; fracas a fortes) que o VRM é capaz de medir ou prever; (ii) são representativas das classes químicas utilizadas no estudo de validação; (iii) refletir as características de desempenho do VRM; (iv) ter estruturas químicas bem definidas; (v) induzir resultados definitivos no método de teste de referência *in vivo*; (vi) estão comercialmente disponíveis; e (vii) não estão associados a custos proibitivos de descarte.

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

[3] Os grupos de embalagem da ONU correspondentes são I, II e III, respectivamente, para o GHS 1A, 1B e 1C da ONU.

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

PROCEDIMENTO

13. Os Procedimentos Operacionais Padrão (Standard Operating Procedures - SOP) para o método de teste de corrosão cutânea na pele de rato já estão disponíveis[19]. Os métodos de teste TER de pele de rato abrangidos por esta diretriz devem cumprir as seguintes condições:

Animais

14. Ratos devem ser usados porque a sensibilidade de sua pele a substâncias neste método de teste foi previamente demonstrada[12] e é a única fonte de pele que foi formalmente validada[8,9]. A idade (quando a pele é coletada) e a linhagem do rato são particularmente importantes para garantir que os folículos capilares estejam na fase de dormência antes do início do crescimento do pelo em adultos.

15. Os pelos dorsal e lateral de ratos jovens, com aproximadamente 22 dias de idade, machos ou fêmeas (descendentes de Wistar ou uma estirpe comparável), são cuidadosamente removidos com pequenos tosquiadores. Em seguida, os animais são lavados cuidadosamente, mergulhando a área raspada em solução antibiótica (contendo, por exemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol e anfotericina, em concentrações eficazes para inibir o crescimento bacteriano). Os animais são lavados com antibióticos novamente no terceiro ou quarto dia após a primeira lavagem e são utilizados dentro de 3 dias após a segunda lavagem, quando o estrato córneo se recuperou da depilação.

Preparação dos discos de pele

16. Animais são eutanasiados quando têm 28-30 dias de idade; essa idade é crítica. A pele dorso-lateral de cada animal é removida e retirada do excesso de gordura subcutânea, removendo com cuidado. Os discos de pele, com um diâmetro de aproximadamente 20mm cada, são removidos. A pele pode ser armazenada antes de usá-la nos discos, dado que já foi comprovado que os dados de controle positivo e negativo são equivalentes àqueles obtidos com a pele fresca.

17. Cada disco de pele é colocado sobre uma das extremidades de um tubo de PTFE (politetrafluoretileno), assegurando que a superfície epidérmica esteja em contato com o tubo. Um anel de borracha “O” é encaixado na extremidade do tubo para manter a pele no lugar e o excesso de tecido é removido. O anel de borracha “O” é então cuidadosamente selado até o final do tubo de PTFE com

vaselina. O tubo é apoiado por um clipe de mola dentro de uma câmara receptora contendo solução de MgSO4 (154mM) (figura 1). O disco de pele deve estar totalmente submerso na solução de MgSO4. Até 10-15 discos de pele podem ser obtidos a partir de uma única pele de rato. As dimensões do tubo e do anel "O" são mostradas na figura 2.

18. Antes do início do teste, o TER de dois discos de pele é medido como um procedimento de controle de qualidade para cada pele do animal. Ambos os discos devem fornecer valores de resistência elétrica maiores que 10kΩ para o restante dos discos a serem usados para o método de teste. Se o valor da resistência for menor que 10kΩ, os discos remanescentes dessa pele devem ser descartados.

Aplicação das substâncias químicas e de controle de teste

19. Controles positivos e negativos simultâneos devem ser usados em cada ensaio para assegurar o desempenho adequado do modelo experimental. Discos de pele de um único animal devem ser usados em cada execução. As substâncias químicas de teste de controle positivos e negativos sugeridas são 10M de ácido clorídrico e água destilada, respectivamente.

20. As substâncias químicas de teste líquidos (150*µ*L) são aplicadas uniformemente na superfície epidérmica dentro do tubo. Ao testar materiais sólidos, uma quantidade suficiente do sólido é aplicada uniformemente ao disco para garantir que toda a superfície da epiderme seja coberta. Água deionizada (150*µ*l) é adicionada por cima do sólido e o tubo é suavemente agitado. Para atingir o máximo contato com a pele, os sólidos podem precisar ser aquecidos a 300°C para derreter ou amolecer a substância química em teste ou serem moídos para produzir um material ou pó granular.

21. Três discos de pele são usados para cada teste e substância química de controle em cada teste. As substâncias químicas de teste são aplicadas durante 24 horas a 20-230°C. A substância química em teste é removida por lavagem com um jato de água corrente à temperatura ambiente até não haver mais outros materiais para remoção.

Medições TER

22. A impedância cutânea é medida como TER usando uma ponte de Wheatstone de baixa tensão e corrente alternada[18]. As especificações gerais da ponte

são tensão de operação de 1-3 volts, corrente alternada sinusoidal ou retangular de 50 - 1000Hz e faixa de medição de pelo menos 0,1 - 30kΩ. O banco de dados utilizado no estudo de validação mediu a indutância, a capacitância e a resistência até os valores de 2000H, 2000F e 2MΩ, respectivamente, nas frequências de 100Hz ou 1kHz, utilizando valores em série ou paralelos. Para efeitos do ensaio de corrosividade TER, as medições são registradas em resistência, a uma frequência de 100Hz e utilizando valores de série. Antes de medir a resistência elétrica, a tensão superficial da pele é reduzida pela adição de um volume suficiente de etanol a 70% para cobrir a epiderme. Após alguns segundos, o etanol é removido do tubo e o tecido é então hidratado pela adição de 3mL de solução de MgSO4 (154mM). Os eletrodos de ponte são colocados em cada lado do disco de pele para medir a resistência em kΩ/disco de pele (figura 1). As dimensões do eletrodo e o comprimento do eletrodo exposto abaixo dos clipes "jacaré" são mostrados na figura 2. O clipe conectado ao eletrodo interno está apoiado na parte superior do tubo de PTFE durante a medição da resistência para garantir que um comprimento consistente de eletrodo esteja submerso na solução de MgSO4. O eletrodo externo é posicionado dentro da câmara do receptor, de modo que fique no fundo da câmara. A distância entre o clipe de mola e a parte inferior do tubo de PTFE é mantida constante (figura 2), porque essa distância afeta o valor de resistência obtido. Consequentemente, a distância entre o eletrodo interno e o disco da pele deve ser constante e mínima (1-2mm).

23. Se o valor da resistência medida for superior a 20kΩ, isso pode ser devido aos restos do revestimento químico de teste da superfície epidérmica do disco da pele. A remoção adicional deste revestimento pode ser tentada, por exemplo, vedando o tubo de PTFE com um polegar enluvado e agitando-o durante aproximadamente 10 segundos; a solução de MgSO4 é descartada e a medição da resistência é repetida com MgSO4 fresco.

24. As propriedades e dimensões do aparato de teste e o procedimento experimental usado podem influenciar os valores de TER obtidos. O limiar corrosivo de 5kΩ foi desenvolvido a partir de dados obtidos com o equipamento e procedimentos específicos descritos nesta diretriz. Diferentes valores de limiar e de controle podem ser usados se as condições do teste forem alteradas ou se for utilizado um aparelho diferente. Portanto, é necessário calibrar a metodologia e os valores do limiar de resistência testando uma série de substâncias de proficiência escolhidas entre as substâncias utilizadas no estudo de validação[8,9], ou de classes químicas semelhantes às substâncias investigadas. Um conjunto de Substâncias de Proficiência adequadas é identificado na tabela 1.

Métodos de ligação de corante

25. A exposição de certos materiais não-corrosivos pode resultar em uma redução da resistência abaixo do ponto de corte de 5kΩ, permitindo a passagem de íons através do estrato córneo, reduzindo assim a resistência elétrica[9]. Por exemplo, substâncias orgânicas neutras e substâncias que possuem propriedades tensoativas (incluindo detergentes, emulsificantes e outros surfactantes) podem remover os lipídios da pele, tornando a barreira mais permeável aos íons. Assim, se os valores de TER produzidos por essas substâncias químicas forem menores ou cerca de 5kΩ na ausência de danos visualmente perceptíveis aos discos de pele, uma avaliação da penetração do corante deve ser realizada nos tecidos de controle e nos tecidos tratados para determinar se os valores de TER obtidos foram o resultado do aumento da permeabilidade cutânea ou da corrosão cutânea[7,9]. No caso deste último, quando o estrato córneo é rompido, o corante sulforhodamina B, aplicado na superfície da pele, penetra rapidamente e mancha o tecido subjacente. Este corante em particular é estável a uma ampla gama de substâncias e não é afetado pelo procedimento de extração descrito abaixo.

Aplicação e remoção de corante Sulforhodamina B

26. Após a avaliação do TER, o sulfato de magnésio é descartado do tubo e a pele é cuidadosamente examinada quanto a danos evidentes. Se não houver nenhum dano mais evidente (como perfuração), 150μl de uma diluição de 10% (p/v) em água destilada do corante sulforhodamina B (ácido vermelho 52; CI 45100; número CAS 3520-42-1), é aplicado na superfície epidérmica de cada disco por 2 horas. Estes discos de pele são lavados com água corrente à temperatura ambiente por aproximadamente 10 segundos para remover qualquer corante em excesso/ não absorvido. Cada disco de pele é cuidadosamente removido do tubo de PTFE e colocado num frasco (como um frasco de vidro de cintilação de 20mL) contendo água deionizada (8mL). Os frascos são agitados suavemente durante 5 minutos para remover qualquer corante adicional não ligado. Este procedimento de enxágue é repetido, os discos de pele são removidos e colocados em frascos contendo 5ml de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 30% (p/v) em água destilada e são incubados durante a noite a 600°C.

27. Após a incubação, cada disco de pele é removido e descartado e a solução remanescente é centrifugada por 8 minutos a 210°C (força centrífuga relativa ~ 175 x g). Uma amostra de 1ml do sobrenadante é diluída 1 em 5 (v/v) [i.e. 1mL + 4mL] com 30% (w/v) de SDS em água destilada. A densidade óptica (DO) da solução é medida a 565nm.

Cálculo do teor de corante

28. O teor de corante sulforhodamina B por disco é calculado a partir dos valores de DO(9) (coeficiente de extinção molar do corante sulforhodamina B a 565nm = 8,7 x IO4; peso molecular = 580). O teor de corante é determinado para cada disco de pele pelo uso de uma curva de calibração apropriada e o teor médio de corante é calculado para as réplicas.

Critérios de aceitação

29. Os resultados médios de TER são aceitos se os valores de controle positivo e negativo concomitantes estiverem dentro dos limites aceitáveis para o método no laboratório. As faixas de resistência aceitáveis para a metodologia e o aparelho descritos acima são dadas na tabela a seguir:

30. Os resultados médios de ligação do corante são aceitos desde que os valores do controle concorrente se situem dentro dos intervalos aceitáveis para o método. Os intervalos de teor de corantes aceitáveis, sugeridos para as substâncias de controle para a metodologia e o aparelho descritos acima, são apresentados no seguinte quadro:

Interpretação de resultados

Controle	**Substância**	**Faixa de Resistência (kΩ)**
Positivo	10M ácido clorídrico	0,5 – 1,0
Negativo	Água destilada	10 – 25

31. O valor de corte do TER que diferencia substâncias químicas de teste corrosivas das não-corrosivas foi estabelecido durante a otimização do método de teste, avaliado durante uma fase de pré-validação e confirmado em um estudo de validação formal.

Controle	**Substância**	**Faixa de conteúdo de corante (μg/disco)**
Positivo	10M ácido clorídrico	40 – 100
Negativo	Água destilada	10 – 25

32. O modelo de previsão para o método de ensaio de corrosão "d" em pele de rato[9,19], associado ao sistema de classificação UN GHS[1], é dado a seguir:

A substância química em estudo é considerada não-corrosiva para a pele:

i) se o valor médio do TER obtido para a substância química em teste for superior a (>) 5kΩ, ou

ii) o valor médio do TER obtido para a substância química em teste é inferior ou igual a (≤) 5kΩ e

- os discos da pele não apresentarem danos evidentes (perfuração); e
- o teor médio de corante do disco for inferior (<) ao teor médio do disco de corante do HCl 10M de controle positivo, obtido simultaneamente (ver parágrafo 30 para valores positivos de controle).

A substância química em estudo é considerada corrosiva para a pele:

i) se o valor médio do TER obtido para a substância química em teste for inferior ou igual a (≤) 5kΩ e a pele nos discos está claramente danificada (perfurada); ou

ii) o valor médio do TER obtido para a substância química em teste é inferior ou igual a (≤) 5kΩ; e

- os discos de pele não apresentam danos evidentes (perfuração), mas
- o teor médio de corante do disco é maior ou igual a (≥) o teor médio de corante do disco do controlo positivo de 10M HCl obtido concorrentemente (ver parágrafo 30 para valores de controle positivos).

33. Um ensaio composto por, pelo menos, três discos de pele replicados deve ser suficiente para uma substância química de ensaio se a classificação é inequívoca. No entanto, nos casos de resultados limítrofes, como medidas repetidas não concordantes e/ou média de TER igual a 5 ± 0,5kΩ, um segundo teste independente deve ser considerado, assim como um terceiro, no caso de resultados discordantes entre os dois primeiros testes.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Valores de resistência (kΩ) e valores de teor de corante (μg/disco) para a substância química em teste, bem como para controles positivos e negativos devem ser relatados em forma tabular, sempre que apropriado, incluindo dados para cada disco replicado individual em cada teste de execução

e valores médios ± desvio-padrão (SD). Todos os experimentos repetidos devem ser relatados. Danos observados nos discos de pele devem ser relatados para cada substância química de teste.

Relatório de teste

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

Substâncias químicas de teste e de controle:

- Substância monoconstituinte: identificação química, como nome IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas conforme apropriado e possível, etc.;
- Substância multiconstituinte, UVCB e mistura: caracterizada, na medida do possível, por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes;
- Aparência física, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;
- Fonte, número do lote, se disponível;
- Tratamento da substância química de teste/ substância de controle antes do teste, se aplicável (aquecimento, moagem);
- Estabilidade da substância química em estudo, data limite de uso ou data para reanálise, se conhecida;
- Condições de armazenamento.

Animais de Teste:

- Linhagem/ raça e sexo usado;
- Idade dos animais se usados como animais doadores;
- Origem, condição de moradia, dieta, etc.;
- Detalhes da preparação da pele.

Condições de teste:

- Curvas de calibragem dos aparelhos de teste;
- Curvas de calibragem para desempenho de teste de ligação de corante, passagem de banda usada para medir os valores de DO e intervalo de linearidade do dispositivo de medição (por exemplo, espectrofotômetro), se apropriado;
- Detalhes do procedimento de teste usado para medições do TER;

- Detalhes do procedimento de teste utilizado para a avaliação da ligação do corante, se apropriado;
- Doses de teste utilizadas, duração do(s) período(s) de exposição e temperatura(s) de exposição;
- Detalhes do procedimento de lavagem utilizado após o período de exposição;
- Número de discos de pele replicados usados por produto químico e controles (positivo e negativo);
- Descrição de qualquer modificação do procedimento de teste;
- Referência aos dados históricos do modelo. Isso deve incluir, mas não está limitado a:
  i) Aceitabilidade dos valores de TER do controle positivo e negativo (em kΩ) com referência às faixas de resistência do controle positivo e negativo;
  ii) Aceitabilidade dos valores do conteúdo do corante de controle positivo e negativo (em μg/disco) com referência a faixas de conteúdo de corante de controle positivo e negativo;
  iii) Aceitabilidade dos resultados do teste com referência à variabilidade histórica entre os replicados do disco de pele.
- Descrição dos critérios de decisão/ modelo de previsão aplicado.

Resultados:

- Tabulação dos dados dos ensaios de ligação TER e corante (se apropriado) para substâncias químicas e controles individuais, para cada teste e cada disco de pele replicado (animais individuais e amostras de peles individuais), médias, SDs e CVs;
- Descrição de quaisquer efeitos observados;
- A classificação derivada com referência ao modelo de previsão/ critérios de decisão usada.

Discussão dos resultados

Conclusões

LITERATURA

(1) United Nations (UN). (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) OECD. (2015). Guideline for Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects (Nº 404): Acute Dermal Irritation, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 431): *In Vitro* Skin Model, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 435) *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 439) *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.Section 4. Health Effects. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD. (2014). Guidance document on Integrated Approached to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (Nº 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.ATLA 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. Toxic.*In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.- G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxic. *In Vitro*12, 483-524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.ATLA23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication Nº 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf]. © OECD, (2015).

(12) EC-ECVAM. (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Trans-

cutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998. Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html]

(13) ECVAM. (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDermTM (EPI-200), EPISKINTM (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication Nº 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [http://www.iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf].

(15) OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Nº 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. Toxicol.24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. Toxicol.*In Vitro* 6,191-194.

(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.Toxicol.Pharmacol. 62, 393-403.

(19) TER SOP. (December 2008). INVITTOX Protocol (Nº 115.) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test. Available at: [http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(20) OECD. (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Figura 1: Aparelho para o ensaio TER da pele de rato

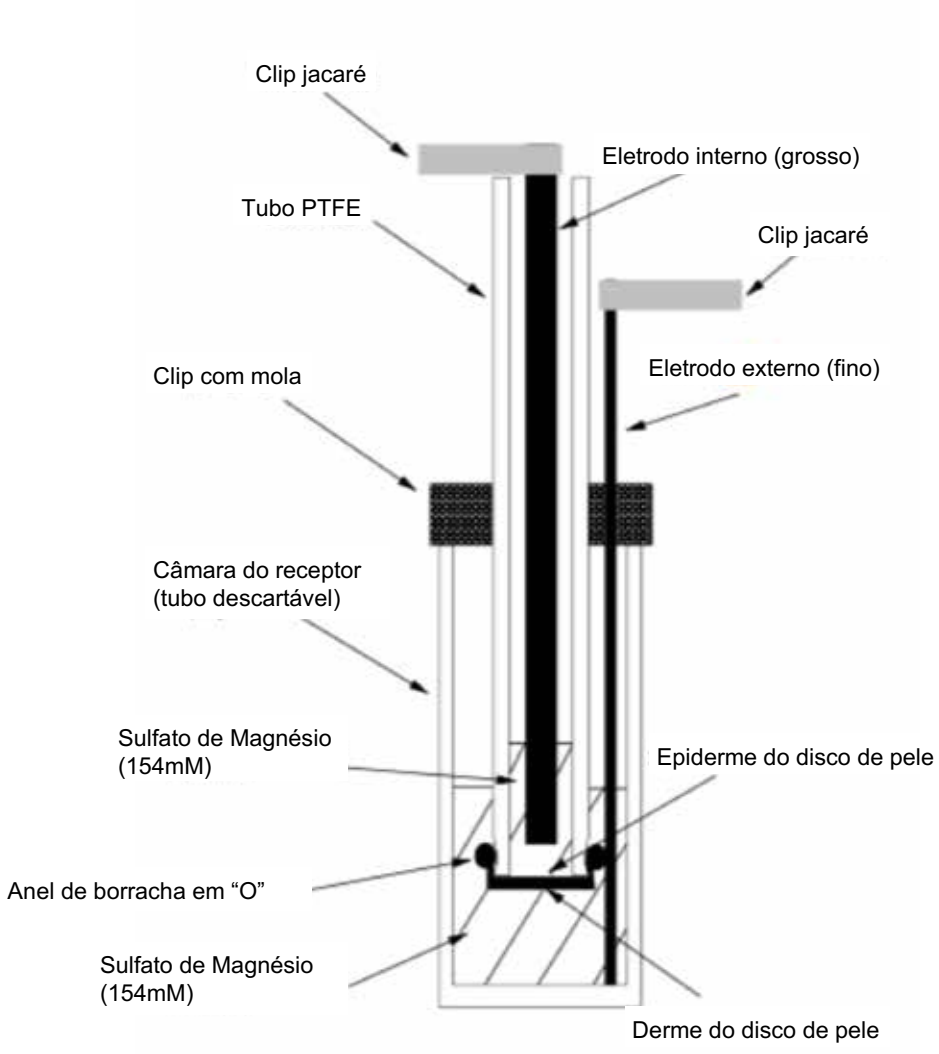
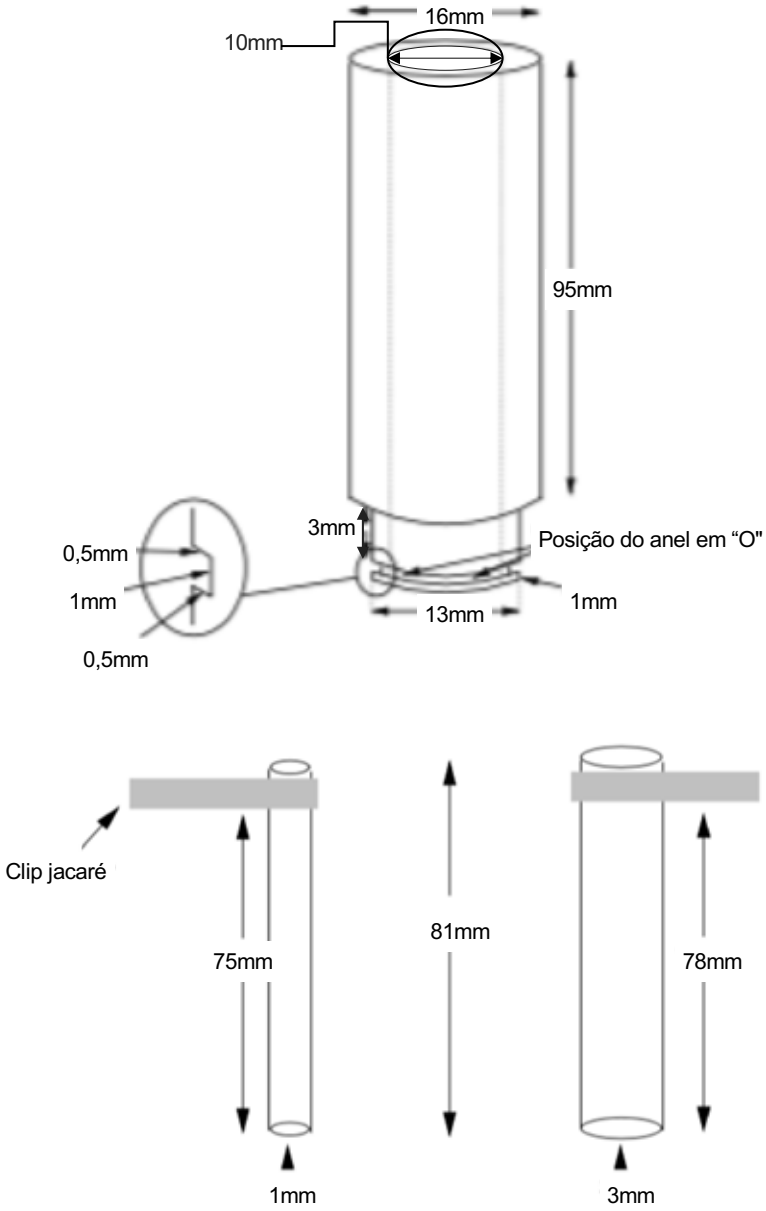


Figura 2: Dimensões dos tubos e eletrodos utilizados para politetrafluoroetileno (PTFE) e receptores usados



Fatores críticos do aparelho mostrado ao lado:

- O diâmetro interno do tubo de PTFE;
- O comprimento dos eletrodos em relação ao tubo de PTFE e ao tubo receptor, de modo que o disco de pele não seja tocado pelos eletrodos e que um comprimento padrão de eletrodo esteja em contato com a solução de MgSO4;
- A quantidade de solução de MgSO4 no tubo receptor deve ter alguma profundidade de líquido, em relação ao nível no tubo de PTFE, como mostrado na figura 1;
- O disco de pele deve ser bem fixado o suficiente no tubo de PTFE, de modo que a resistência elétrica seja uma medida real das propriedades da pele.

ANEXO 1

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de relevância. O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância" para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste[20].

C: corrosivo.

Substância química: significa produto químico ou mistura.

Concordância: esta é uma medida do desempenho do método de teste que fornecem um resultado categórico e é um dos aspectos de relevância. O termo é algumas vezes usado de forma sinônima à precisão e é definido como a proporção de todas as substâncias químicas testadas que são classificadas corretamente como positivas ou negativas. A concordância é altamente dependente da prevalência de positivos nos tipos de substâncias químicas testadas[20].

GHS (Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (ONU)): um sistema que propõe a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas) de acordo com os tipos e níveis padronizados

de riscos físicos, de saúde e ambientais, abordando elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, declarações de perigo, declarações de precaução e fichas de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o ambiente[1].

AITA: Abordagem Integrada em Teste e Avaliação.

Mistura: significa uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem.

Substância monoconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, na qual um constituinte principal está presente em pelo menos 80% (p/p).

Substância multiconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que mais de um constituinte principal está presente numa concentração $\geq$10% (p/p) e $<$80% (p/p). Uma substância multiconstituinte é o resultado de um processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela mistura de duas ou mais substâncias sem reação química. Uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

NC: não-corrosivo.

DO: densidade óptica.

PC: controle positivo (do inglês Positive Control), um replicado contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Padrões de desempenho (PS): padrões, baseados em um método de teste validado, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método de teste proposto que é mecânica e funcionalmente similar. Inclui: (i) componentes essenciais do método de teste; (ii) uma lista mínima de Substâncias Químicas de Referência selecionados dentre as substâncias químicas utilizados para de-

monstrar o desempenho aceitável do método de teste validado; e (iii) os níveis semelhantes de confiabilidade e precisão, com base no que foi obtido para o método de teste validado, e que o método de teste proposto deve demonstrar quando avaliado usando a lista mínima de Substâncias Químicas de Referência.

Relevância: descrição da relação do método de teste com o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a maneira em que o método de teste mede ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[20].

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado replicavelmente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, quando realizado usando o mesmo protocolo. É avaliado pelo cálculo da reprodutibilidade intra e interlaboratorial[20].

Sensibilidade: a proporção de todas as substâncias químicas positivas/ ativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[20].

Corrosão da pele in vivo: a produção de danos irreversíveis da pele; isto é, necrose visível através da epiderme e na derme, após a aplicação de uma substância química teste por até quatro horas. As reações corrosivas são caracterizadas por úlceras, sangramento, feridas sangrentas e, ao final da observação, aos 14 dias, por descoloração devido ao branqueamento da pele, áreas completas de alopecia e cicatrizes. A histopatologia deve ser considerada para avaliar lesões questionáveis.

Especificidade: a proporção de todas as substâncias químicas negativas/ inativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[20].

Substância: significa os elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo neces-

sário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo usado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou alteração da sua composição.

(Teste) executado: um único teste químico testado simultaneamente em um mínimo de três discos de pele replicados.

Teste químico: significa o que está sendo testado.

Resistência Elétrica Transcutânea (TER): é uma medida da impedância elétrica da pele, como um valor de resistência em kilo Ohms. Um método simples e robusto de avaliar a função de barreira, registrando a passagem de íons através da pele usando um aparelho ponte de Wheatstone.

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

Adotado: 29 de julho de 2016

DIRETRIZ DA OECD PARA O ENSAIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS - 431

Corrosão cutânea in vitro: método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE, Recunstructed Human Epidermis)

INTRODUÇÃO

1. A corrosão cutânea refere-se à produção de danos irreversíveis na pele, que se manifestam como necrose visível, através da epiderme e na derme, após a aplicação de uma substância química [como definido pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS) das Nações Unidas (ONU)][1]. A Diretriz de Teste 431 atualizada fornece um procedimento *in vitro* que permite a identificação de substâncias e misturas não corrosivas e corrosivas, de acordo com o GHS da ONU[1]. Também permite a subcategorização parcial de corrosivos.

2. A avaliação do potencial de corrosão cutânea das substâncias químicas envolve a utilização de animais de laboratório (Diretriz de Teste (DT) 404, originalmente adotada em 1981 e revista em 1992, 2002 e 2015)[2]. Além da atual DT 431, dois outros métodos de teste *in vitro* para testar o potencial de corrosão de substâncias químicas foram validados e adotados como Guia de Teste 430[3] e Guia de Teste 435[4]. Além disso, o teste *in vitro* TG 439[5] foi adotado para avaliar o potencial de irritação cutânea. Um documento sobre Abordagens Integradas para Testes e Avaliação (AITA), para corrosão e irritação da pele, descreve vários módulos que agrupam fontes de informação e ferramentas de análise, fornecendo orientação sobre: (i) como integrar e usar dados de teste e de não teste existentes para avaliação de irritação cutânea e potenciais de corrosão cutânea de substâncias químicas e (ii) proposta de uma abordagem para quando são necessários mais testes[6].

3. Esta Diretriz de Teste aborda a corrosão cutânea do ponto final da saúde humana. Utiliza a epiderme humana reconstruída (RhE) (obtida a partir de queratinócitos epidérmicos não transformados derivados de humanos) que imita de perto as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das partes superiores da pele humana, isto é, a epiderme. Esta Diretriz de Teste, originalmente adotada em 2004, foi atualizada em 2013 para incluir métodos de teste adicionais, usando os modelos RhE, e pela possibilidade de usar os métodos

para apoiar a subcategorização de substâncias químicas corrosivas. Foi novamente atualizada em 2015, para se referir ao documento de orientação da AITA e para apresentar o uso de um procedimento alternativo para medir a viabilidade.

4. Quatro métodos de teste validados usando modelos de RhE disponíveis no mercado estão incluídos nesta Diretriz de Teste.

Estudos de pré-validação[7], seguidos de um estudo formal de validação para avaliar a corrosão da pele[8-10] foram conduzidos[11,12] com dois destes testes disponíveis, o EpiSkinTM Standard Model (SM) e o EpiDerm™ SkinCorrosivity Test (SCT) (EPI-200) (referido no texto a seguir como métodos de referência validados – *MRV, Validated Reference Methods* em inglês). O resultado desses estudos levou à recomendação de que os dois MRV mencionados acima poderiam ser usados para fins regulatórios na distinção entre substâncias corrosivas (C) e não corrosivas (NC) e que o EpiSkin™ poderia ser usado como suporte à subcategorização de substâncias corrosivas[13-15]. Outros dois métodos de teste RHE comercialmente disponíveis para testar corrosão cutânea *in vitro* mostraram resultados similares ao MRV do EpiDerm™, de acordo com a validação baseada em procedimento padrão[16-18]. São o SkinEthic™RHE[1] e o epiCS® (previamente conhecido como ES-1000), os quais também podem ser usados para finalidades regulatórias, na distinção entre substâncias corrosivas e não corrosivas[19-20]. Estudos de pós-validação, realizados pelos produtores do modelo RhE nos anos de 2012 a 2014, com um protocolo refinado, corrigindo interferências de redução inespecífica de MTT pelas substâncias químicas, melhoraram o desempenho, tanto da discriminação de C/NC quanto dando suporte à subcategorização de corrosivos[21;22]. Análises estatísticas adicionais dos dados de pós-validação gerados com o EpiDerm™SCT, o SkinEthic™RHE e o epiCS® foram realizadas, para identificar modelos de predições alternativas que melhorassem a capacidade preditiva de subcategorização[23].

7. Antes de se usar um método de teste de RhE, similar ou modificado, para a corrosão da pele, que seja diferente dos MRV, para fins regulatórios, sua confiabilidade, sua relevância (precisão) e suas limitações para o uso proposto devem ser determinadas para garantir sua similaridade com os MRV, em cumprimento aos requisitos das Normas de Desempenho (NP, standard procedures/SP, em inglês)[24] estabelecidas em conformidade com os princípios do Documento de Orientação nº 34[25]. A Aceitação Mútua de Dados somente será garantida após

qualquer método de teste proposto, novo ou atualizado, que siga as NP, ter sido revisado e incluído nesta Diretriz de Teste. Os métodos de testes incluídos nesta Diretriz de Teste podem ser usados para avaliar exigências dos países quanto a resultados de testes *in vitro* para a corrosão da pele, enquanto se beneficiem da aceitação mútua de dados.

[1] A abreviatura RhE (= Epiderme humana reconstruída) é utilizada para todos os modelos baseados na tecnologia RhE. A abreviatura RHE, tal como utilizada em conjunto com o modelo SkinEthicTM, significa o mesmo, mas, como parte do nome deste método de teste específico, tal como comercializado, está escrito tudo em maiúsculas.

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Esta Diretriz de Teste permite a identificação de substâncias e misturas não corrosivas e corrosivas, de acordo com o GHS da ONU[(1)]. Esta Diretriz de Teste também apoia a subcategorização de substâncias e misturas corrosivas na Subcategoria 1A opcional, de acordo com o GHS da ONU[(1)], bem como uma combinação das subcategorias 1B e 1C[(21-23)]. Uma limitação desta Diretriz de Teste é não permitir discriminar entre subcategoria 1B e subcategoria 1C quanto à corrosividade cutânea, de acordo com o GHS da ONU[(1)], devido ao conjunto conhecido de substâncias químicas corrosivas cutânea *in vitro* da subcategoria 1C. Os testes EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ RHE e epiCS® são capazes de subcategorizar as substâncias (1A versus 1B – e – 1C versus NC).

8. Ampla gama de substâncias químicas, representando principalmente substâncias individuais, foi testada na validação que apoia os métodos de teste incluídos nesta Diretriz de Teste, ao serem usadas para identificação de não corrosivos e corrosivos; a base de dados empíricos do estudo de validação foi de 60 substâncias químicas, cobrindo ampla gama de classes químicas[(8-10)]. Os testes para demonstrar a sensibilidade, a especificidade, a precisão e a replicabilidade dentro do laboratório, para a subcategorização, foram realizados pelos desenvolvedores do método de teste e os resultados foram revisados pela OECD[(21-23)]. Com base nos dados gerais disponíveis, a Diretriz de Teste é aplicável à ampla gama de clas-

ses químicas e estados físicos, incluindo líquidos, semissólidos, sólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não aquosos; os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Sempre que possível, os sólidos devem ser moídos até se tornarem um pó fino antes da aplicação; nenhum outro tratamento prévio da amostra é necessário. Nos casos em que evidências demonstrarem a não aplicabilidade dos métodos de ensaio incluídos na Diretriz a uma categoria específica de substâncias químicas de teste, estes métodos de ensaio não devem ser utilizados para essa categoria específica de substâncias químicas. Além disso, presume-se que esta Diretriz de Teste seja aplicável a misturas como uma extensão de sua aplicabilidade a substâncias. No entanto, as misturas abrangem amplo espectro de categorias e composição, para as quais as informações disponíveis na atualidade são limitadas quanto aos testes com elas. Nos casos em que podem ser demonstradas provas da não aplicabilidade da Diretriz de Teste à categoria de misturas (seguindo uma estratégia como proposto na referência de literatura 26), a diretriz não deverá ser utilizada para essa categoria específica de misturas.

Antes de usar a Diretriz de Teste em uma mistura, para gerar dados para uma finalidade regulatória pretendida, deve-se considerar se e por que ela pode fornecer resultados adequados para essa finalidade. Tais considerações não são necessárias quando há uma exigência regulamentar para o teste da mistura. Gases e aerossóis ainda não foram avaliados em estudos de validação[8-10]. Embora seja concebível que possam ser testados usando-se a tecnologia RhE, a Diretriz de Teste atual não permite testes de gases e aerossóis.

9. Substâncias químicas de teste que absorvem luz na mesma faixa do MTT formazan e aquelas capazes de reduzir diretamente o corante vital MTT (para MTT formazan) podem interferir nas medições de viabilidade tecidual e precisam do uso de controles adaptados para correções. O tipo de controles adaptados que podem ser necessários variará dependendo do tipo de interferência produzida pelo substância química de teste e do procedimento usado para medir o MTT formazan (ver parágrafos 25-31).

10. Embora esta Diretriz de Teste não forneça informações adequadas sobre irritação cutânea, deve-se notar que a DT 439 aborda especificamente o efeito da irritação sobre a saúde cutânea *in vitro* e é baseada no mesmo sistema de teste RhE, embora usando outro protocolo[5]. Para a avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma única exposição dérmica, o Documento de Orientação Nº

203, sobre Abordagens Integradas para Testes de Avaliação, deve ser consultado[6]. Esta abordagem da AITA inclui a realização de testes *in vitro* para a corrosão cutânea (como descrito nesta Diretriz de Teste) e para a irritação cutânea antes de considerar testes em animais vivos. É reconhecido que o uso de pele humana está sujeito a considerações e condições éticas nacionais e internacionais.

PRINCÍPIO DO TESTE

11. O substância química em estudo é aplicada topicamente a um modelo tridimensional de RhE, constituído por queratinócitos epidérmicos não transformados, derivados de humanos, que foram cultivados para formar um modelo altamente diferenciado da epiderme humana em multicamadas. Consiste de camadas basais, espinhosas e granulares organizadas e de um estrato córneo multicamadas, contendo camadas lipídicas intercelulares lamelares, representando as principais classes de lipídios análogas às encontradas *in vivo*.

12. O método de teste de RHE baseia-se na premissa de que substâncias químicas corrosivas são capazes de penetrar no estrato córneo por difusão ou erosão e são citotóxicas para as células nas camadas subjacentes. A viabilidade celular é medida por conversão enzimática do corante vital MTT brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio; CAS número 298-93-1], num sal de azul de formazan que é quantitativamente medido após extração de tecidos[27].

As substâncias químicas corrosivas são identificadas pela sua capacidade de diminuir a viabilidade celular abaixo dos limites definidos (ver parágrafos 35 e 36). Os métodos de teste de corrosão cutânea baseados em RhE demonstraram ser preditivos dos efeitos de corrosão cutânea in vivo avaliados em coelhos, de acordo com a Diretriz de Teste 404[2] da OECD.

DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA

13. Antes do uso rotineiro de qualquer um dos quatro métodos de teste de RhE validados por este Guia de Teste, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, classificando corretamente as 12 Substâncias de Proficiência listadas na tabela 1. No caso do uso de um método para subclassificação, também a subcategorização correta deve ser demonstrada. Em situações em que uma substância listada não esteja disponível ou quando seja justificável, pode ser utilizada

outra substância para a qual estejam disponíveis dados de referência *in vivo* e *in vitro* adequados (como da lista de substâncias químicas de referência[24]), desde que os mesmos critérios de seleção descritos na tabela 1 sejam aplicados.

Tabela 1:
Lista de Substâncias de Proficiência[1]

Substância	CASRN	Classe química[2]	Cat. UN GHS baseado em resultados *in vivo*[3]	Cat. VRM baseada em resultados *in vitro*[4]	Redutor MTT5	Estado físico
Subcategoria 1A corrosíveis *in vivo*						
Ácido bromoacético	79-08-3	Ácido orgânico	1A	(3) 1A	-	S
Di-hidrato de trifluoreto de boro	13319-75-0	Ácido inorgânico	1A	(3) 1A	-	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	-	S
dicloroacetil	79-36-7	Eletrófilo	1A	(3) 1A	-	L
Combinação de corrosivos de subcategorias 1A - e - 1B						
Brometo de fenetilo	103-63-9	Eletrófilo	NC	(3) NC	Y	L
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Base orgânica	NC	(3) NC	-	S
4- (metiltio) - benzaldeído	3446-89-7	Eletrófilo	NC	(3) NC	Y	L
Ácido laurico	143-07-7	Ácido orgânico	NC	(3) NC	-	S

Abreviaturas: CASRN = Número de registro do Chemical Abstracts Service; UN GHS = Sistema Globalmente Harmonizado das Nações Unidas[1]; VRM = Método de Referência Validado; NC = Não-Corrosivo

[1] As substâncias de proficiência, classificadas primeiro por corrosivos versus não-corrosivos, depois por subcategoria corrosiva e depois por classe química, foram selecionadas dentre as substâncias usadas nos estudos de validação ECMVAM de EpiSkinTM e EpiDDermTM[8-10] e de estudos de pós-validação, baseados em dados fornecidos pelo EpiSkinTM[22], desenvolvedores de EpiDermTM, SkinEthicTM e epiCS®[23]. Salvo indicação em contrário, as substâncias foram testadas no nível de pureza obtido quando compradas de uma fonte comercial[8,10].

A seleção inclui, na medida do possível, substâncias que: (i) são representativas da faixa de respostas de corrosividade (por exemplo, não-corrosivas; fracas a fortemente corrosivas) que os VRMs são capazes de medir ou prever; (ii) são representativos das classes químicas utilizadas nos estudos de validação; (iii) ter estruturas químicas bem definidas; (iv) induzir resultados reprodutíveis no MRV; (v) induzir resultados definitivos no método de teste de referência in vivo; (vi) estão comercialmente disponíveis; e (vii) não estão associados a custos proibitivos de descarte.

[2] Classe química atribuída por Barrat al.[8].

[3] Os grupos de embalagem da ONU correspondentes são I, II e III, respectivamente, para o GHS 1A, 1B e 1C da ONU.

[4] As previsões VRM in vitro relatadas nesta tabela foram obtidas com os métodos de teste EpiSkinTM e EpiDermTM (VRMs) durante os testes pós-validação realizados pelos desenvolvedores do método de teste.

[5] Os valores de viabilidade obtidos nos Estudos de Validação da Corrosão cutânea do ECVAM não foram corrigidos para a redução direta do MTT (controles dos mortos não foram realizados nos estudos de validação). No entanto, os dados de pós-validação gerados pelos desenvolvedores do método de teste que são apresentados nesta tabela foram obtidos com controles adaptados[23].

14. Como parte do exercício de proficiência, recomenda-se que o usuário verifique as propriedades de barreira dos tecidos após o recebimento, conforme especificado pelo fabricante do modelo RhE. Isso é particularmente importante se os tecidos forem enviados em períodos de longa distância/tempo. Depois de um método de teste ter sido estabelecido com sucesso e de a proficiência em seu uso ter sido demonstrada, tal verificação não será mais necessária. No entanto, ao usar um método de teste com frequência, recomenda-se continuar a avaliar as propriedades da barreira em intervalos regulares.

PROCEDIMENTO

15. A seguir, temos uma descrição genérica de componentes e procedimentos dos métodos de teste de RhE para avaliação da corrosão cutânea abrangidos por esta Diretriz de Teste. Os modelos de RhE endossados como cientificamente válidos para uso dentro desta Diretriz de Teste, ou seja, os modelos EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPi-200), SkinEthic™RHE e epiCS®[16-19,28-31,33], podem ser obtidos de fontes comerciais. Os Procedimentos Operacionais Padrão (POP, em inglês Standard Operational Procedures) para estes quatro modelos de RhE estão disponíveis[34-37] e seus principais componentes são resumidos no anexo 2. Recomenda-se que o POP pertinente seja consultado ao se implementar e se usar um desses métodos no laboratório. Os testes com os quatro métodos de teste de RhE cobertos por esta Diretriz de Teste devem estar de acordo com o seguinte:

COMPONENTES DO MÉTODO DE TESTE RhE

Condições Gerais

16. Os queratinócitos humanos não transformados devem ser usados para re-

construir o epitélio. Múltiplas camadas de células epiteliais viáveis (camada basal, estrato espinhoso, estrato granuloso) devem estar presentes sob um estrato córneo funcional. O estrato córneo deve ser multicamadas, contendo o perfil lipídico essencial para produzir uma barreira funcional com robustez para resistir à penetração rápida de substâncias químicas citotóxicas de referência, como o dodecil-sulfato de sódio (SDS) ou o Triton X-100. A função de barreira deve ser demonstrada e pode ser avaliada pela determinação da concentração na qual uma substância química de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50% (IC_{50}), após um tempo de exposição fixo, ou pela determinação do tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade em 50% (ET_{50}), mediante a aplicação da substância química de referência numa concentração fixa e determinada (ver parágrafo 18). As propriedades de contenção do modelo RhE devem impedir a passagem de material ao redor do estrato córneo para o tecido viável, o que levaria à modelagem inadequada da exposição da pele. O modelo RhE deve estar livre de contaminação por bactérias, vírus, micoplasmas ou fungos.

Condições Funcionais

Viabilidade

17. O teste utilizado para quantificar a viabilidade dos tecidos é o ensaio MTT[27]. As células viáveis da construção de tecido RhE reduzem o corante vital MTT em um precipitado de azul de formazan MTT, que é extraído do tecido, usando isopropanol (ou um solvente similar). A Densidade Óptica (DO) do solvente de extração em si deve ser suficientemente pequena, ou seja, DO $<0,1$. O MTT formazan extraído pode ser quantificado, usando uma medição de absorbância (DO) padrão ou um procedimento de espectrofotometria por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução, em inglês High Pressure Liquid Chromatography) / UPLC (Cromatografia Líquida de Ultrapressão, em inglês, Ultra Pressure Liquid Chromatography)[38]. Os usuários do modelo RhE devem garantir que cada lote do modelo RhE usado atenda aos critérios definidos para o controle negativo. Uma faixa de aceitabilidade (limites superior e inferior) para os valores DO de controle negativo deve ser estabelecida pelo fabricante/fornecedor do modelo RhE. As faixas de aceitabilidade para os valores DO do controle negativo, para os quatro métodos de teste de RhE validados incluídos nesta Diretriz de Teste, são fornecidos na tabela 2.

Um usuário de espectrofotometria por HPLC/UPLC deve usar as faixas de DO de controle negativo fornecidas na tabela 2 como critério de aceitação para controle

negativo. Deve ser documentado que os tecidos tratados com controle negativo são estáveis em cultura (proporcionam medições DO similares) durante o período de exposição.

Tabela 2: Intervalos de aceitabilidade para valores de DO de controle negativo para controlar a qualidade do lote

	Limite inferior de aceitação	**Limite superior de aceitação**
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥0,8	≤ 3,0
epiCS®	≥ 0,8	≤ 2,8

Função de barreira

18. O estrato córneo e a sua composição lipídica devem ser suficientes para resistir à penetração rápida de determinadas substâncias químicas citotóxicas de referência (por exemplo, SDS ou Triton X-100), conforme estimado por IC_{50} ou ET_{50} (tabela 3). A função de barreira de cada lote do modelo RhE usado deve ser demonstrada pelo desenvolvedor/fornecedor do modelo RhE quando do fornecimento dos tecidos ao usuário final (ver parágrafo 21).

Morfologia

19. O exame histológico do modelo de EHE deve ser realizado, demonstrando-se a estrutura em epiderme humana em multicamadas, contendo estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo, e deve exibir perfil lipídico semelhante ao da epiderme humana. O exame histológico de cada lote do modelo de RhE usado, demonstrando a morfologia apropriada dos tecidos, deve ser fornecido pelo desenvolvedor/fornecedor do modelo de RhE no momento do fornecimento dos tecidos ao usuário final (ver parágrafo 21).

Replicabilidade

20. Os usuários do método de teste devem demonstrar a replicabilidade dos métodos ao longo do tempo com os controles positivos e negativos.

Além disso, o método de teste deve ser usado somente se o desenvolvedor/fornecedor do modelo RhE fornecer dados que demonstrem sua replicabilidade

ao longo do tempo, com substâncias químicas corrosivas e não-corrosivas da lista de substâncias de proficiência (tabela 1). No caso do uso de um método de teste para subcategorização, a replicabilidade em relação à subcategorização também deve ser demonstrada.

Controle de qualidade (CQ)

21. O modelo RhE só deve ser utilizado se o fabricante/fornecedor demonstrar que cada lote do modelo RhE utilizado satisfaz os critérios definidos para a liberação da produção, entre os quais, os mais relevantes são: viabilidade (parágrafo 17), função de barreira (parágrafo 18) e morfologia (parágrafo 19). Esses dados são fornecidos aos usuários do método de teste, para que possam incluir essas informações no relatório de teste. Somente os resultados produzidos com lotes de tecidos aceitos pelo CQ podem ser aceitos para uma previsão confiável da classificação corrosiva. Um intervalo de aceitabilidade (limites superior e inferior) para o IC_{50} ou o ET_{50} é estabelecido pelo fabricante/fornecedor do modelo RhE. Os intervalos de aceitabilidade para os quatro métodos de teste validados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Critérios de liberação do lote do CQ

	Limite inferior de aceitação	**Limite superior de aceitação**
EpiSkin™ (SM) (tratamento de 18 horas com SDS[33]	IC_{50} = 1.0 mg/mL	IC_{50} = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1% Triton X-100)[34]	ET_{50} = 4.0 horas	ET_{50} = 8,7 horas
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100)[35]	ET_{50} = 4.0 horas	ET_{50} =10.0 horas
epiCS® (1% Triton X-100)[36]	ET_{50} = 2.0 horas	ET_{50} = 7.0 horas

Aplicação das Substâncias Químicas e de Controle de Teste

22. No mínimo, duas réplicas de tecido devem ser usadas para cada substância química em teste e de controle em cada período de exposição. Para substâncias químicas, bem como sólidas, deve ser aplicada quantidade suficiente de substância química de teste, para cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando uma dose infinita, i.e., no mínimo, 70μL/cm^2 ou 30mg/cm^2 devem ser usados. Dependendo dos métodos, a superfície da epiderme deve ser umedecida com água deionizada ou destilada antes da aplicação de substâncias quí-

micas sólidas, para melhorar o contato entre a substância química de teste e a superfície da epiderme[34-37]. Sempre que possível, os sólidos devem ser testados como um pó fino.

O método de aplicação deve ser apropriado para a substância química em estudo (ver referências 34 a 37). No final do período de exposição, a substância química em estudo deve ser cuidadosamente lavada da epiderme com um tampão(*) aquoso ou NaCl a 0,9%. Dependendo de qual dos quatro métodos de teste RhE validados é usado, dois ou três períodos de exposição são empregados por substância química de teste (para todos os quatro modelos RhE válidos: 3 min e 1 hora; para EpiSkin™, o tempo de exposição adicional de 4 horas). Dependendo do método de teste utilizado e do período de exposição avaliado, a temperatura de incubação durante a exposição pode variar entre a temperatura ambiente e 37°C.

23. Controles negativos (CN) e positivos simultâneos (CP) devem ser usados em cada execução para demonstrar que a viabilidade (com controles negativos), a função de barreira e a sensibilidade tecidual resultante (com o CP) dos tecidos estão dentro de uma faixa de aceitação histórica definida. Os substâncias químicas sugeridas para CP são ácido acético glacial ou KOH 8N (hidróxido de potássio), dependendo do modelo de RhE usado. Deve notar-se que o KOH 8N é um redutor de MTT direto, que pode requerer controles adaptados, como descrito nos parágrafos 25 e 26. Os controles negativos sugeridos são 0,9% (p/v) de NaCl ou água.

N. da Trad. Tampão aqui se refere a buffer, uma solução que resiste a mudanças no pH quando ácido ou álcali é adicionado a ele. Buffers tipicamente envolvem um ácido fraco ou alcalino juntamente com um dos seus sais.

Medidas de Viabilidade Celular

24. O ensaio MTT, que é um ensaio quantitativo, deve ser utilizado para medir a viabilidade celular sob orientação desta Diretriz de Teste[27]. A amostra de tecido é colocada em solução de MTT de concentração apropriada (0,3 ou 1mg/mL) por 3 horas. O produto precipitado azul de formazan é extraído do tecido usando-se um solvente (por exemplo, isopropanol, ácido isopropanol) e a concentração de formazan é medida através da determinação da DO a 570nm usando-se um filtro de passagem de banda máxima de ±30nm, ou por um procedimento de espectrometria por HPLC/UPLC (ver parágrafos 30 e 31)[38].

25. Testes químicos podem interferir no ensaio MTT, seja por redução direta do MTT em azul de formazan e/ou por interferência de cor, se a substância química em teste absorver, naturalmente ou devido a procedimentos de tratamento, na mesma faixa de formazan (570 ± 30nm, principalmente substâncias químicas azuis e roxas). Devem ser usados controles adicionais para detectar e corrigir uma possível interferência destas substâncias químicas de teste, como o controle de redução de MTT não específico (NSMTT, *Non specific* MTT) e o controle de cor não específica (NSC *non-specific* color) (ver parágrafos 26 a 30). Isto é especialmente importante quando uma substância química de teste não é completamente removida do tecido por enxágue ou quando ela penetra na epiderme, estando presente nos tecidos quando o teste de viabilidade do MTT é realizado. A descrição detalhada de como corrigir a redução direta do MTT e as interferências dos agentes corantes está disponível nos POP para os métodos de teste[34-37].

26. Para identificar redutores diretos de MTT, cada substância química de teste deve ser adicionada ao meio MTT preparado na hora[34-37]. Se a mistura de MTT, contendo o composto químico, ficar azul ou roxa, presume-se que o teste químico reduz diretamente o MTT e uma verificação funcional adicional na epiderme não viável deve ser realizada, independentemente da medição de absorbância padrão (DO) ou de procedimento de espectrofotometria por UPLC/HPLC. Esta verificação funcional adicional emprega tecidos mortos, que possuem apenas atividade metabólica residual, mas absorvem a substância química em quantidade semelhante aos tecidos viáveis. Cada substância química redutora de MTT é aplicada em, pelo menos, duas réplicas de tecidos mortos por período de exposição ao teste de corrosão da pele. A verdadeira viabilidade tecidual é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidual obtida com tecidos vivos expostos ao redutor de MTT, menos a porcentagem de redução não específica de MTT obtida com os tecidos mortos expostos ao mesmo redutor de MTT, calculada em relação ao controle negativo executado simultaneamente ao teste a ser corrigido (% NSMTT).

27. Deve-se fazer uma análise espectral da substância química de teste em água (meio ambiente durante a exposição) e/ou isopropanol (solução extratora), para identificar possíveis interferências por substâncias químicas coloridas ou testadas que ficam coloridas quando em contato com água ou com isopropanol, para decidir sobre a necessidade de controles adicionais. Se a substância química em teste em água e/ou isopropanol absorver luz na faixa de 570 ±30nm, devem ser realizados controles adicionais de colorantes ou, alternativamente, um proce-

dimento de espectrofotometria por HPLC/UPLC pode ser usado, quando esses controles não são necessários (ver parágrafos 30 e 31). Ao realizar a medição da absorbância padrão (DO), cada substância química colorida interferente é aplicada em, pelo menos, duas réplicas de tecido viáveis por período de exposição, sendo submetidas a todo o teste de corrosão da pele, sendo incubados com solução de meio em vez de MTT, durante a etapa de incubação MTT, para gerar o controle de cores não específicas (NSC_{living}). O controle NSC_{living} precisa ser executado simultaneamente, pelo período de exposição por cada teste químico colorido (em cada execução), devido à variabilidade biológica inerente dos tecidos vivos. A verdadeira viabilidade tecidual é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidual obtida com tecidos vivos expostos à substância química interferente e incubada com solução de MTT, menos a porcentagem de cor não específica obtida com tecidos vivos expostos à substância química interferente e incubada com meio sem MTT, executados simultaneamente, para o teste a ser corrigido (% NSC_{living}).

28. As substâncias químicas de teste, identificadas como produtoras de redução direta de MTT (ver parágrafo 26) e interferência de cores (ver parágrafo 27), também exigirão um terceiro conjunto de controles, além dos controles NSMTT e NSC_{living} descritos nos parágrafos anteriores, ao aplicar a medição de absorbância (DO). Este é geralmente o caso de substâncias químicas de teste de cores escuras que interferem com o teste MTT (por exemplo, azul, roxo, preto), porque sua cor intrínseca impede a avaliação de sua capacidade de reduzir diretamente o MTT, conforme descrito no parágrafo 26. Estas substâncias químicas podem se ligar a tecidos vivos e mortos e, portanto, o controle NSMTT pode não apenas corrigir a potencial redução direta do MTT, pela substância química em teste, mas também a interferência da cor decorrente da ligação da substância química em teste aos tecidos mortos. Isso poderia levar à dupla correção de interferência de cor, uma vez que o controle NSC_{living} já corrige a interferência de cor decorrente da ligação da substância química em teste aos tecidos vivos.

Para evitar uma possível dupla correção para interferência de cores, um terceiro controle para cores não específicas em tecidos mortos (NSC_{killed}) precisa ser realizado. Neste controle adicional, a substância química em teste é aplicada em, pelo menos, duas réplicas de tecido morto por tempo de exposição, que são submetidos a todo o procedimento de teste, mas são incubados com meio em

vez de solução MTT durante o passo de incubação. Um único controle NSC_{killed} é suficiente por teste químico, independentemente do número de testes/execuções independentes feitas, mas deve ser realizado simultaneamente ao controle NS-MTT e, quando possível, com o mesmo lote de tecido. A verdadeira viabilidade tecidual é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidual obtida com tecidos vivos expostos à substância química de teste, menos a porcentagem de NSMTT, menos a porcentagem de NSC_{living}, mais a porcentagem de cor não específica obtida com tecidos mortos expostos à substância química interferente e incubados com meio sem MTT, calculada em relação ao controle negativo executado simultaneamente ao teste sendo corrigido (% NSC_{killed}).

29. É importante notar que a redução não específica do MTT e as interferências de cor não específicas podem aumentar as leituras do extrato de tecido acima da faixa de linearidade do espectrofotômetro. Nesta base, cada laboratório deve determinar o intervalo de linearidade do seu espectrofotômetro com MTT formazan (CAS # 57360-69-7) de uma fonte comercial, antes de iniciar o teste de substâncias químicas para fins regulatórios. Em particular, a medição de absorbância padrão (DO) usando-se um espectrofotômetro é apropriada para avaliar redutores MTT diretos e substâncias químicas de teste de interferência de cor quando as DO dos extratos de tecido, obtidos com a substância química teste sem qualquer correção para redução direta de MTT e/ou interferência de cor, estão dentro da faixa linear do espectrofotômetro ou quando a viabilidade percentual não corrigida, obtida com a substância química em teste, já o definiu como corrosivo (ver parágrafos 35 e 36). Apesar de tudo, os resultados para substâncias químicas de teste que produzem % NSMTT e/ou % NSC_{living} $\geq$50% de controle negativo devem ser tomados com cautela.

30. Para substâncias químicas de teste coloridas, que não são compatíveis com a medição de absorbância padrão (DO), devido à forte interferência com o ensaio MTT, o procedimento alternativo de espectrofotometria por HPLC/UPLC para medir o MTT formazan pode ser empregado (ver parágrafo 31)[37]. O sistema de espectrofotometria por HPLC/UPLC permite a separação do MTT formazan da substância química em teste antes da sua quantificação[38]. Por esse motivo, os controles NSC_{living} ou NSC_{killed} nunca são necessários ao se usar a espectrofotometria HPLC/UPLC, independentemente da substância química a ser testada.

Os controles NSMTT devem, no entanto, ser usados se houver suspeita de que a substância química em teste reduza diretamente o MTT ou tenha uma cor que impeça a avaliação da capacidade de reduzir diretamente o MTT (conforme descrito no parágrafo 26). Quando se utiliza espectrofotometria por HPLC/UPLC para medir o MTT formazan, calcula-se a percentagem de viabilidade tecidual como percentagem da área do pico do MTT formazan obtida com tecidos vivos expostos à substância química em teste, relativamente ao pico do MTT formazan obtido com o controle negativo concorrente. Para substâncias químicas de teste capazes de reduzir diretamente o MTT, a viabilidade tecidual real é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidual obtida com tecidos vivos expostos à substância química de teste, menos %NSMTT. Finalmente, deve-se notar que os redutores de MTT diretos – que também podem interferir com a cor, sendo retidos nos tecidos após o tratamento e reduzindo o MTT tão fortemente que levam a DO (usando medição DO padrão) ou áreas de pico (usando-se espectrofotometria por UPLC/HPLC) dos extratos de tecidos testados que não se enquadram na gama de linearidade do espectrofotômetro – não podem ser avaliados, embora se espere que ocorram apenas em situações muito raras.

31. A espectrofotometria por HPLC/UPLC também pode ser utilizada com todos os tipos de substâncias químicas de teste (redutores coloridos, não coloridos, MTT e não MTT) para a medição de MTT formazan[38]. Devido à diversidade de sistemas de espectrofotometria HPLC/UPLC, a qualificação do sistema de espectrofotometria HPLC/UPLC deve ser demonstrada antes de seu uso, para quantificar o MTT formazan a partir de extratos de tecido, atendendo aos critérios de aceitação para um conjunto de parâmetros de qualificação padrão, baseados naqueles descritos na orientação da Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para a indústria sobre validação de método bioanalítico[38-39]. Estes parâmetros-chave e seus critérios de aceitação são mostrados no anexo 4. Uma vez que os critérios de aceitação definidos no anexo 4 sejam satisfeitos, o sistema de espectrofotometria por HPLC/UPLC é considerado qualificado e pronto para medir o MTT formazan sob as condições experimentais descritas nesta Diretriz de Teste.

Critérios de Aceitação

32. Para cada método de teste usando modelos RhE válidos, os tecidos tratados com o controle negativo devem exibir as DO que reflitam a qualidade dos tecidos, conforme descrito na tabela 2, e não devem estar abaixo dos limites historica-

mente estabelecidos. Os tecidos tratados com o CP, como ácido acético glacial ou 8N KOH, devem refletir sua capacidade para responder a uma substância química corrosiva sob as condições de teste (ver anexo 2).

A variabilidade entre as repetições da substância química e/ou das substâncias de controle deve estar entre os limites aceitáveis para cada modelo válido de RhE (ver anexo 2) – por exemplo, a diferença de viabilidade entre as duas réplicas de tecido não deve exceder 30%. Se tanto o controle negativo, quanto o CP incluído em uma execução estiverem fora dos intervalos aceitos, a execução será considerada não qualificada e deverá ser repetida. Se a variabilidade das substâncias químicas de teste estiver fora do intervalo definido, seus testes devem ser repetidos.

Interpretação de Resultados e Modelo de Predição

33. Os valores de DO obtidos para cada substância química em teste devem ser usados para calcular a porcentagem de viabilidade relativa ao controle negativo, que é estabelecido em 100%. No caso de ser utilizada espectrofotometria por HPLC/UPLC, a percentagem de viabilidade tecidual é calculada como a área do pico de % MTT formazan obtida com tecidos vivos expostos à substância química em teste, relativamente ao pico de MTT formazan obtido com o controle negativo concorrente.

A percentagem de corte dos valores de viabilidade celular, que distingue a substância química corrosiva da não corrosiva (ou que discriminam entre diferentes subcategorias corrosivas), é definida nos parágrafos 35 e 36 – para cada um dos métodos de ensaio abrangidos por esta Diretriz de Teste – e deve ser usada para interpretar os resultados.

34. Uma única execução de ensaio composta por, pelo menos, duas réplicas de tecidos deve ser suficiente para uma substância química em estudo, quando a classificação resultante for inequívoca. No entanto, em casos de resultados limítrofes, como medições replicadas não concordantes, uma segunda execução pode ser considerada, assim como uma terceira, no caso de resultados discordantes entre as duas primeiras execuções.

35. O modelo de predição para o método de teste de corrosão cutânea EpiSkin[9;34;22], associado ao sistema de classificação UN GHS[1], é mostrado na tabela 4:

Tabela 4: Modelo de predição do EpiSkin™

Viabilidade medido após intervalos de tempo de exposição (t = 3, 60 e 240 minutos)	**Previsão a ser considerada**
<35% depois de exposição de 3 minutos	Corrosivo
	Subcategoria 1A opcional *
≥35% depois de exposição de 3 minutos E	Corrosivo Combinação de subcategorias 1N e 1C opcional
<35% depois de exposição de 60 minutos	
OU	
≥ 35% depois de exposição de 60 minutos E	
<35% depois de exposição de 240 minutos	
≥ 35% depois de exposição de 240 minutos	Não-corrosivo

(*) De acordo com os dados gerados, tendo em vista avaliar a utilidade dos métodos de teste de RhE para apoiar a subcategorização, foi demonstrado que cerca de 22% dos resultados da Subcategoria 1A do método de teste EpiSkinTM podem realmente constituir Subcategoria 1B ou Substâncias/ misturas da Subcategoria 1C (sobre classificações) (ver anexo 3).

36. Os modelos de predição para a corrosão cutânea EpiDerm SCT[10;23;35], o SkinEthicTM RHE[17;18;23;36] e o epiCS®[16;23;37]. Os métodos de teste, associados ao sistema de classificação UN GHS[1], são mostrados na tabela 5:

Tabela 5: EpiDermTMSCT, SkinEthicTM RHE e epiCS®

Viabilidade medido após intervalos de tempo de exposição (t = 3 e 60 minutos)	**Previsão a ser considerada**
PASSO 1 PARA EpiDerm TM SCT, para SkinEthicTM RHE e epiCS®	
<50% depois de 3 minutos de exposição	Corrosivo
≥50% depois de 3 minutos de exposição E	Corrosivo
<15% depois de 60 minutos de exposição	
≥50% depois de 3 minutos de exposição E	Não-corrosivo
≥15% depois de 60 minutos de exposição	
PASSO 2 PARA EpiDerm TM SCT - para substâncias/ misturas identificadas como Corrosivas no Passo 1	
<25% depois de 3 minutos de exposição	Subcategoria 1A opcional
≥25% depois de 3 minutos de exposição	Uma combinação de subcategorias 1B e 1C opcional

Viabilidade medido após intervalos de tempo de exposição (t = 3 e 60 minutos)	**Previsão a ser considerada**
PASSO 2 PARA SkinEthicTM RHE - para substâncias/ misturas identificadas como Corrosivas no Passo 1	
<18% depois de 3 minutos de exposição	Subcategoria 1A opcional
≥18% depois de 3 minutos de exposição	Uma combinação de subcategorias 1B e 1C opcional
PASSO 2 PARA SepiCS® - para substâncias/ misturas identificadas como Corrosivas no Passo 1	
<15% depois de 3 minutos de exposição	Subcategoria 1A opcional
≥15% depois de 3 minutos de exposição	Uma combinação de subcategorias 1B e 1C opcional

** De acordo com os dados gerados para avaliar a utilidade dos métodos de teste de RhE para apoiar a subcategorização, foi demonstrado que cerca de 29%, 31% e 33% dos resultados da subcategoria 1A dos métodos EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE e epiCS®, respectivamente, podem, na verdade, constituir substâncias/ misturas da subcategoria 1B ou da subcategoria 1C (ou seja, super-classificações) (ver anexo 3).*

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

37. Para cada teste, os dados das replicações teciduais individuais (os valores de DO e a percentagem calculada de viabilidade celular para cada substância química em estudo, incluindo a classificação) devem ser relatados em forma de tabela, incluindo dados de experiências repetidas, conforme apropriado. Além disso, as médias e as faixas de viabilidade e os CV entre os tecidos replicados para cada teste devem ser relatados. As interações observadas com o reagente MTT por redutores MTT diretos ou substâncias químicas de teste coloridos devem ser relatadas para cada substância química testada.

Relatório de teste

38. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

Testar substâncias químicas e de controle:

- Substância monoconstituinte: identificação química, como nome IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas conforme apropriado e praticamente viável, etc.;

- Substância multiconstituinte, UVCB e mistura: caracterizada tanto quanto possível por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes;
- Aparência física, solubilidade em água e quaisquer outras propriedades físico-químicas relevantes;
- Fonte, número do lote, se disponível;
- Tratamento da substância química/ substância de controle antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem);
- Estabilidade da substância química em estudo, data limite de uso ou data para reanálise, se conhecida;
- Condições de armazenamento.

Modelo de RhE e protocolo usado e justificativa para isso (se aplicável)

Condições de teste:

- Modelo de RhE utilizado (incluindo o número do lote);
- Informação de calibragem para dispositivo de medição (espectrofotômetro), comprimento de onda e passagem de banda (se aplicável) utilizada para quantificar MTT formazan e a gama de linearidade do dispositivo de medição;
- Descrição do método usado para quantificar o MTT formazan;
- Descrição da qualificação do sistema de espectrofotometria HPLC / UPLC, se aplicável;
- Informações completas de suporte para o modelo RhE específico usado, incluindo seu desempenho. Isso deve incluir, mas não está limitado a:
  - i) Viabilidade;
  - ii) Função de barreira;
  - iii) Morfologia;
  - iv) Reprodutibilidade e capacidade preditiva;
  - v) Controles de qualidade (CQ) do modelo.
- Referência aos dados históricos do modelo. Isso deve incluir, mas não se limita à aceitabilidade dos dados de CQ com referência aos dados históricos do lote;
- Demonstração de proficiência na realização do método de teste antes do uso rotineiro, testando as substâncias de proficiência.

Procedimento de Teste:

- Detalhes do procedimento de teste utilizado (incluindo procedimentos de lavagem usados após o período de exposição);
- Doses de substâncias químicas e de controle utilizadas;
- Duração do(s) período(s) de exposição e temperatura(s) de exposição;
- Indicação dos controles utilizados para os redutores MTT diretos e/ou os químicos de ensaio de coloração, se aplicável;
- Número de réplicas de tecido usadas por substância química de teste e controles (PC, controle negativo e NSMTT, NSC_{living} e NSC_{killed}, se aplicável), por tempo de exposição;
- Descrição dos critérios de decisão / modelo de predição aplicados com base no modelo de RhE utilizado;
- Descrição de quaisquer modificações do procedimento de teste (incluindo procedimentos de lavagem).

Critérios de aceitação de execução e teste:

- Valores médios de controle positivo e negativo e faixas de aceitação, baseado em dados históricos;
- Variabilidade aceitável entre réplicas de tecidos para controle positivo e negativo;
- Variabilidade aceitável entre réplicas de tecido de substância química de teste.

Resultados:

- Tabulação de dados para substância químicas de teste e de controles por indivíduo, para cada período de exposição, cada execução e cada medição replicada, incluindo área do pico da OD ou MTT formazan, percentagem de viabilidade do tecido, percentagem média de viabilidade do tecido, diferenças entre réplicas, SDs e/ou CVs, se aplicável;
- Se aplicável, os resultados dos controles utilizados para os redutores MTT diretos e/ou substâncias químicas para coloração, incluindo a área do pico da OD ou MTT formazan,% NSMTT,% NSCliving,% NSCkilled, diferenças entre as réplicas, SDs e/ou CVs (se aplicável), e viabilidade tecidual percentual final correta;
- Resultados obtidos com o(s) produto(s) químico(s) de teste e substâncias de controle em relação aos critérios de aceitação definidos;

- Descrição de outros efeitos observados;
- A classificação derivada com referência ao modelo de previsão/ critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

LITERATURA

(1) UN. (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html]

(2) OECD. (2015). Guideline for Testing of Chemicals. (Nº 404.): Acute Dermal Irritation, Corrosion, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 430.): In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 435.): In Vitro Membrane Barrier Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 439.): In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (Nº 203.) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on In Vitro Skin Corrosivity Testing.The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.ATLA23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. Toxicol.In Vitro 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.- G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.In Vitro 12, 483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, ATLA 28, pp. 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23, 129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication Nº 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf].

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM (EPI-200), EPISKINTM (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: In Vitro Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication Nº 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.Availableat:[http://www.iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf].

(14) EC-ECVAM. (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkinTM Test (an In Vitro Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998. Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

(15) EC-ECVAM. (2000). Statement on the Application of the EpiDermTM Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for In Vitro Skin Corrosivity Testing.Toxicol.In Vitro 19, 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model Ski-

nEthic RHE for In Vitro Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431.Toxicol.In Vitro 20, 547 559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010).Adaptation of the Validated Skin-EthicTM Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm2 Tissue Sample.Toxicol. In Vitro 24, 1379-1385.

(19) EC-ECVAM. (2006). Statement on the Application of the SkinEthicTM Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006. Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

(20) EC-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an In-Vitro Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009. Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

(21) OECD. (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation.Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 190).Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by EpiSkinTM Reconstruction Human Skin Epidermis Test method according toUN GHS Revision of OECD Test Guideline 431.Toxicol. In Vitro 28, 131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline Nº 431.Toxicol. In Vitro 29, 2055-2080.

(24) OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(25) OECD. (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment..Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. et al. (2012). Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.Toxicol. Pharmacol. 62, 393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(28) Tinois E., et al. (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis In Vitro. In: In Vitro Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. Toxicol.In Vitro 8, 889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, WeeRhEim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203, 211-225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). In Vitro and Post Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. Exp. Cell Res. 193: 310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. Cytotech. 9, 163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications.Biotech.Bioeng.43/8, 747-756.

(34) EpiSkingTM, (December 2011), SOP, INVITTOX Protocol (Nº 118). EpiSkiTM Skin Corrosivity Test, Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.hm;].

(35) EpiDermTMSOP, (February 2012), Version MK-24-007-0024Protocol for: In VitroEpiDermTMCorrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal.

(36) SkinEthicTM RHE SOP, INVITTOX Protocol (January 2012). SkinEthicTM Skin Corrosivity Test. Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

(37) EpiCS® SOP, Version 4.1 (January 2012). In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®)CellSystems. Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in Preparation.

(39) US FDA. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

ANEXO 1

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de relevância. O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância" para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste[25].

Viabilidade celular: parâmetro que mede a atividade total de uma população celular, como a capacidade de as desidrogenases mitocondriais celulares reduzirem o corante vital MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo), que, dependendo do ponto final medido e do desenho de teste utilizado, correlaciona-se com o número total e/ou vitalidade das células vivas.

Substância química: significa uma substância ou mistura.

Concordância: esta é uma medida do desempenho do método para testes que fornecem um resultado categórico e é um aspecto de relevância. O termo é algumas vezes usado de forma intercambiável com precisão e é definido como a proporção de todos os substâncias químicas testadas que são classificados corretamente como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência de positivos nos tipos de substâncias químicas testadas[25].

ET50: pode ser estimado pela determinação do tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50% após a aplicação do substância química de referência em uma concentração fixa e especificada. Consulte também IC50.

GHS: (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias químicas): um sistema que propõe a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas) de acordo com os tipos e níveis padronizados

de riscos físicos, de saúde e ambientais, e endereça os elementos de comunicação correspondentes, tais como pictogramas, palavras, declarações de perigo, declarações de precaução e fichas de dados de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o ambiente[1].

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance.

IATA: Abordagem Integrada em Teste e Avaliação.

IC50: Pode ser estimado pela determinação da concentração na qual um substância química de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50% (IC50) após um tempo de exposição fixo, ver também ET50.

Dose infinita: Quantidade de substância química de teste aplciada à epiderme excedendo a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície da epiderme.

Mistura: significa uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem.

Substância monoconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que um das principais constituintes está presente em, pelo menos, 80% (p/p).

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

Substância multiconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, na qual mais de um constituinte principal estão presentes na concentração $>$10% (p/p) e $<$80% (p/p). Uma substância constituinte é o resultado de um processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela combinação de duas ou mais substâncias sem reação química. Uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

NC: não-corrosivo.

Controle NSC_{killed}: controle não específico de cores em tecidos mortos.

Controle NSC_{living}: controle não específico de cores em tecidos vivos.

NSMTT: redução de MTT não específica.

DO: densidade óptica.

PC: Controle Positivo (em inglês, Positive Control), é um replicado contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

*Padrões de desempenho (PS):*padrões, baseados em um método de teste validado, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método de teste proposto que é mecanicamente e funcionalmente similar. Incluído são: (i) componentes essenciais do método de teste; (ii) uma lista mínima de Substâncias químicas de Referência selecionados dentre os substâncias químicas utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de teste validado; e (iii) os níveis semelhantes de confiabilidade e precisão, com base no que foi obtido para o método de teste validado, que o método de teste proposto deve demonstrar quando avaliado usando a lista mínima de Substâncias químicas de Referência[25].

Relevância: descrição da relação do método de teste para o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a medida em que o método de teste mede ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[25].

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado replicavelmente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, quando realizado usando o mesmo protocolo. É avaliado pelo cálculo da reprodutibilidade intra e interlaboratorial[25].

Execução: consiste em um ou mais substâncias químicas de teste testadas simultaneamente com um controle negativo e com um PC.

Sensibilidade: a proporção de todos os substâncias químicas positivas/ ativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[25].

Corrosão cutânea in vivo: a produção de danos irreversíveis da pele; isto é, necrose visível através da epiderme e na derme, após a aplicação de um substância química de teste por até quatro horas. As reações corrosivas são caracterizadas por úlceras, sangramento, escaras sanguinolentas e, ao final da observação aos 14 dias, por descoloração devido ao branqueamento da pele, áreas completas de alopecia e cicatrizes. A histopatologia deve ser considerada para avaliar lesões questionáveis.

Especificidade: a proporção de todos os substâncias químicas negativas/ inativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[25].

Substância: significa os elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo usado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou alteração da sua composição.

Substância química de Teste: significa o que está sendo testado.

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra-Alto Desempenho.

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

ANEXO 2

Componentes do método de teste principal dos métodos de teste de RhE validados para testes de corrosão na pele

Componentes do método de teste	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT
Superfície do modelo	0,38 cm^2	0,63 cm^2
Número de replicados de tecido	Pelo menos, 2 por período de exposição	2 a 3 por período de exposição
Doses e aplicação	Liquidos e viscosos: 50 μL ± 3 μL (131.6 $\mu L/cm^2$)	Líquidos: 50 μL (79.4 $\mu L/cm^2$) com ou sem rede de nylon
	Sólidos: 20 + 2 mg (52.6 mg/cm^2) + 100 μL ± 5μL NaCl solution (9 g/L)	Pré-teste de compatibilidade do produto químico de teste com rede de nylon
	Cerosos/ espessos: 50 + 2 mg (131.6 mg/cm^2) com rede de nylon	Semi-sólidos: 50 μL (79.4 $\mu L/cm^2$))
		Sólidos: 25 μL H_2O (ou mais se necessário) + 25 mg (39.7 mg/cm^2)
		Ceras: peça plana tipo disco de ca. 8 mm de diâmetro colocado sobre o tecido umedecido com 15μL de H_2O
Pré-verificação para redução MTT direta	50 μL (líquido) ou 20 mg (sólido)	50 μL (líquido) ou 25 mg (sólido) + 1 mL MTT
	+ 2 mL MTT	Solução de 1 mg/mL por 60 min a 37ºC, 5% CO2, 95% RH
	solução de 0.3 mg/mL s para 180	Se a solução se tornar azul ou roxa, deve-se realizar o controle adaptado de morte por congelamento
	5 min at 37ºC, 5% CO_2, 95% RH	
	Se a solução se tornar azul ou roxa, deve-se realizar o controle adaptado de morte por água	
Pré-verificação para interferência de cores	10 μL (líquido) ou 10 mg (sólido) + 90 μL H_2O misturado por 15 min em RT	50 μL (líquido) ou 25 mg (sólido) + 300 μL H_2O or 60 min a 37ºC, 5% de CO_2, 95% RH
	Se a solução ficar colorida, deve-se relizar controles vivos adaptados	Se a solução ficar colorida, deve-se relizar controles vivos adaptados
Tempo e temperatura de exposição	3min, 60min (+ 5min) e 240 min (+ 10 min) em cabine ventilada	3 min em RT e 60 min a 37ºC, 5% CO_2, 95% RH
	Temperatura da sala (RT, 18 - 28oC)	
Enxague	25 mL 1 x PBS (2 mL/em jato)	20 vezes com fluxo constante de] 1x PBS
Controle Negativo	50 μL de solução de NaCl (9 g/L) Testado com cada tempo de exposição	50 μL de H_2O
	Testado com cada tempo de exposição	Testado com cada tempo de exposição
Controle Positivo	50 μL de ácido acético glacial	- 50 μL 8N KOH
	Testar por apenas 4 horas	Testado com cada tempo de exposição
Solução MTT	2 mL 0.3 mg/mL	300 μL 1 mg/mL
Tempo de incubação e temperatura do MTT	180 min (+ 15 min) a 37ºC, 5% CO_2, 95% RH	80 min a 37ºC, 5% CO_2, 95% RH

SkinEthic™ RHE	**epiCS®**
0,5 cm^2	0,6 cm^2
Pelo menos, 2 por período de exposição	Pelo menos, 2 por período de exposição
Líquidos e viscosos: 40 μL ± 3μl (80 $\mu L/cm^2$) usando rede de nylon	Líquidos: 50 μL (83.3 $\mu L/cm^2$)usando rede de nylon
Pré-teste de compatibilidade do produto químico de teste com rede de nylon	Pré-teste de compatibilidade do produto químico de teste com rede de nylon
Sólidos: 20μL±2μlH2O+20 3mg (40 mg/cm^2)	Semi-sólidos: 50 μL (83.3 $\mu L/cm^2$)
Cerosos e espessos: 20 + 3 mg (40 mg/cm^2) usando rede de nylon	Sólidos : 25 mg (41.7 mg/cm^2) + 25 μL H_2O (ou mais, se ncessário)
	Cerosos: peça plana tipo disco de ca. 8 mm de diâmetro colocado sobre o tecido umedecido com 15μL de H_2O
40 μL (líquido) ou 20 mg (sólido)	50 μL (líquido) ou 25 mg (sólido) + 1 mL MTT
+ 1 mL MTT	Solução de 1 mg/mL por 60 min a 37°C, 5% CO_2, 95% RH
Solução de 1 mg/mL por 180 ± 15 min a 37°C, 5% CO_2, 95% RH	Se a solução se tornar azul ou roxa, deve-se realizar o controle adaptado de morte por congelamento
Se a solução se tornar azul ou roxa, deve-se realizar o controle adaptado de morte por congelamento	
40 μL (líquido) ou 20mg (sólido) + 300 μL H_2O misturado por 60 min em RT	50 μL (líquido) ou 25 mg sólido) + 300 μL H_2O por 60 min a 37°C, 5% CO_2, 95% RH
Se a solução ficar colorida, deve-se relizar controles vivos adaptados	Se a solução ficar colorida, deve-se relizar controles vivos adaptados
3 min em RT e 60 min a 37°C, 5% CO_2, 95% RH	3 min em RT e 60 min a 37°C, 5% CO_2, 95% RH
20 vezes com fluxo constante de] 1x PBS	20 vezes com fluxo constante de] 1x PBS
50 μL de H_2O	40 μL de H_2O
Testado com cada tempo de exposição	Testado com cada tempo de exposição
40 μL de H_2O	50 μL de H_2O
Testado com cada tempo de exposição	Testado com cada tempo de exposição
300 μL 1 mg/mL	300 μL 1 mg/mL
180 min (± 15 min) a 37°C, 5% CO_2, 95% RH	180 min a 37°C, 5% CO_2, 95% RH

ANEXO 3

Desempenho dos métodos de ensaio para subcategorização

A tabela abaixo fornece os desempenhos dos quatro métodos de teste, calculados com base em um conjunto de 80 substâncias químicas testadas pelos quatro desenvolvedores de teste. Os cálculos foram realizados pelo Secretariado da OECD, revisados e acordados por um subgrupo de especialistas[21,23].

Os métodos de teste EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthicTMeepiCS® são capazes de subcategorizar (ou seja, 1A *versus* 1B e 1C *versus* NC)

Performances, taxas de superclassificação, taxas de subclassificação e precisão (capacidade preditiva) dos quatro métodos de teste com base em um conjunto de 80 substâncias químicas testadas em 2 ou 3 execuções em cada método de teste:

ESTATÍSTICAS SOBRE PREDIÇÕES OBTIDAS EM TODO O CONJUNTO DE PRODUTOS QUÍMICOS				
(n = 80 produtos químicos testados em duas execuções independentes para epiCS® ou 3 séries independentes para EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ e SkinEthic™ RHE, respectivamente, classificações 159* ou 249 *um produto químico testado uma vez em epiCS® por conta de indisponibilidade[23]				
	EpiSkin™	**Epiderm™**	**SkinEthic™**	**epiCS®**
Superclassificação				
1B e 1C superclassificado com 1A	21.5%	29.0%	31.2%	32.8%
NC superclassificado com 1B e 1C	20.7%	23.4%	27.0%	28.4%
NC superclassificado com 1A	0.0%%	2.7%	0.0%	0.0%
Corr. De superclassificação	20.7%	26.1%	27.0	28.4%
Taxa de superclassificação global	17.9%	23.3%	24.5%	25.8%
Subclassificação				
1A subclassificado como 1B e 1C	16.7%	26.7%	16.7%	12.5%
1A subclassificado como NC	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1B e 1C subclassificado com NC	2.2%	0.0%	7.5%	6.6%
Taxa de subclassificação global	3.3%	2.5%	5.4%	4.4%
Classificações Corretas				
1A corretamente classificado	83.3%	83.3%	83.3%	87.4%
1B e 1C corretamente classificado	76.3%	71.0%	61.3%	60.7%
NC corretamente classificado	79.3	73.9%	73.0%	71.62%
Precisão geral	78.8%	74.2%	70.0%	69.8%

NC: não-corrosivo

ANEXO 4

Parâmetros-chave e critérios de aceitação para qualificação de um sistema de espectrofotometria de HPLC / UPLC para medição de MTT formazan extraído de tecidos de RhE

Parâmetro	Protocolo derivado do Guia FDA[37-38]	Critérios de Aceitação
Seletividade	Análise de isopropanol, vazio vivo (extracto de isopropanol a partir de tecidos de RhE vivos sem qualquer tratamento), vazio morto (extrato de isopropanol de tecidos RhE mortos sem qualquer tratamento)	$Area_{interference} < 20\%$ da $Area_{LLOQ}$[1]
Precisão	Controles de qualidade (ou seja, MTT formazan a 1,6 μg / mL, 16 μg / mL e 160 μg / mL) em isopropanol (n = 5)	CV ≤ 15% ou ≤20% para o LLOQ
Acuracidade	Controles de qualidade no ispropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15% ou ≤20% para LLOQ
Efeito de Matriz	Controles de qualidade no vazio vivo (n = 5)	85% ≤ Efeito da matriz% ≤ 115%
Transferência	Análise de isopropanol depois de USLOQ[2] padrão	$Area_{interference} \leq 20\%$ da $Area_{LLOQ}$[1]
Replicabilidade (intra-dia)	3 curvas de calibração independentes (com base em 6 diluições de 1/3 consecutivas de MTT formazan em isopropanol começando em ULOQ, isto é, 200 μg / mL); Controles de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curva de calibração: % Dev ≤ 15% ou < 20% para LLOQ
Replicabilidade (inter-dia)	Curva de calibração do dia 1: 1 e controles de qualidade em isopropanol (n = 3)	
	Curva de calibração do dia 2: 1 e controles de qualidade em isopropanol (n = 3)	
	Curva de calibração do dia 3: 1 e controles de qualidade em isopropanol (n = 3)	
Estabilidade de curto prazo do MTT formazan no extrato RhE de tecido	Controles de Qualidade em vazio vivo (n = 3), analisados no dia da preparação e após 24 horas de armazenamento à temperatura ambiente	% Dev ≤ 15%
Estabilidade de longo prazo do MTT formazan no extrato RhE de tecido, se exigido	Controles de Qualidade em vazio vivo (n = 3), analisados no dia da preparação e após vários dias de armazenamento à temperatura de 4ºC, -20ºC, -80ºC	% Dev ≤ 15%

[1]LLOQ: Limite inferior de quantificação, definido para cobrir 1-2% de viabilidade tecidual, ou seja, 0,8μg/mL.

[2]ULOQ: Limite Superior de Quantificação, definido como sendo pelo menos duas vezes superior à concentração de MTT formazan mais elevada esperada em extratos de isopropanol a partir de controles negativos, isto é, 200μg/mL.

Adotado: 28 de julho de 2015

Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 435

Teste de membrana de barreira in vitro para corrosão da pele

INTRODUÇÃO

1. Corrosão cutânea refere-se à produção de danos cutâneos irreversíveis, manifestando-se como necrose visível através da epiderme e na derme, que acontece após a aplicação de um teste químico, conforme definido pelo Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem das Nações Unidas (ONU) de substâncias químicas (GHS)[1]. Esta Diretriz 435 atualizada fornece um método de teste de membrana de barreira *in vitro* que pode ser usado para identificar substâncias químicas corrosivas. O método de teste utiliza uma membrana artificial projetada para responder a substâncias químicas corrosivas de maneira similar à da pele do animal *in situ*.

2. A corrosividade da pele tem sido tradicionalmente avaliada aplicando-se a substância química em teste na pele de animais vivos e avaliando-se a extensão do dano tecidual após período fixo de tempo[2]. Além da presente Diretriz, vários outros métodos de teste *in vitro* foram adotados como alternativas[3,4] ao procedimento padrão de pele de coelho *in vivo* (OECD TG 404) usado para identificar substâncias químicas corrosivas[2]. A estratégia de testes e avaliação do GHS da ONU, para avaliação e classificação da corrosividade cutânea, e o documento de orientação da OECD sobre Abordagens Integradas para Testes e Avaliação (AITA) para Irritação/Corrosão da Pele recomendam o uso de métodos de teste validados e aceitos *in vitro* nos módulos 3 e 4[1,5]. A AITA descreve vários módulos que agrupam fontes de informação e ferramentas de análise e fornece orientações sobre: (i) como integrar e usar os dados de teste e não teste existentes para avaliação dos potenciais de irritação e corrosão cutâneas e (ii) propõe uma abordagem quando mais testes são necessários, incluindo quando resultados negativos são encontrados[5]. Nessa abordagem modular, resultados positivos de métodos de testes *in vitro* podem ser usados para classificar um produto químico como corrosivo, sem a necessidade de testes em animais, reduzindo e refinando o uso de animais e evitando a dor e o sofrimento que poderiam ocorrer se animais fossem usados para este fim.

3. Estudos de validação foram concluídos para o método de teste de barreira *in vitro* comercialmente disponível como Corrositex®[6-8], mostrando precisão geral para prever a corrosividade cutânea de 79% (128/163), sensibilidade de 85% (76/89) e especificidade de 70% (52/74) para um banco de dados de 163 substâncias e misturas[7]. Com base na sua validade reconhecida, este método de teste de referência validado (VRM) foi recomendado para uso como parte de uma estratégia de testes em camadas para avaliar o potencial de risco de corrosão dérmica de substâncias químicas[5,7]. Antes que um método de teste de barreira *in vitro* para corrosão cutânea possa ser usado para fins regulatórios, suas confiabilidade, relevância (precisão) e limitações, para o uso proposto, devem ser determinadas, para assegurar que seja similar àquele do VRM[9], de acordo com os padrões de desempenho pré-definidos (PS)[10]. A Aceitação Mútua de Dados somente será garantida após qualquer método de teste novo ou atualizado proposto após o PS desta Diretriz ter sido revisado e incluído nesta Diretriz. Atualmente, apenas um método de ensaio *in vitro* é abrangido por esta Diretriz – o método de teste Corrositex® comercialmente disponível.

4. Outros métodos de ensaio para efeitos de corrosão cutânea baseiam-se na utilização de pele humana reconstituída (OECD TG 431)[3] e pele de rato isolada (OECD TG 430)[4]. Esta Diretriz também fornece subcategorização de substâncias químicas corrosivas nas três subcategorias de corrosividade do GHS da ONU e nos três grupos de embalagem de transporte da ONU para riscos de corrosividade. Esta Diretriz foi originalmente adotada em 2006 e atualizada em 2015, para se referir ao documento de orientação da AITA e atualizar a lista de substâncias de proficiência.

DEFINIÇÕES

5. As definições utilizadas são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

6. O teste descrito neste guia permite a identificação de substâncias químicas de teste corrosivas e permite a subcategorização de substâncias químicas de teste corrosivas de acordo com o GHS da ONU (tabela 1)[1]. Além disso, esse método de ensaio pode ser utilizado para tomar decisões sobre a corrosividade e a não-

-corrosividade de classes específicas de produtos químicos; por exemplo, ácidos orgânicos e inorgânicos, derivados ácidos[1] e bases para determinados testes de transporte[7,11-12]. Esta Diretriz descreve um procedimento genérico semelhante ao método de teste de referência validado[7]. Embora esta Diretriz não forneça informações adequadas sobre a irritação da pele, deve ser notado que a Diretriz 439 aborda especificamente o efeito, sobre a saúde, da irritação cutânea *in vitro*[13]. Para a avaliação completa dos efeitos locais da pele após uma única exposição cutânea, o Documento de Orientação nº 203, sobre Abordagens Integradas para Testes de Avaliação, deve ser consultado[5].

Tabela 1. Categoria e Subcategorias Corrosivas da Pele do GHS da ONU[1]

Categoria Corrosiva (categoria 1) aplica-se a autoridades que não usam subcategorias)	**Subcategorias potencialmente corrosivas (aplica-se somente a algumas autoridades)**	**Corrosivo em ≥1 de 3 animais**	
		Exposição	**Observação**
Corrosivo	Subcategoria corrosiva 1A	≤ 3 minutos	≤ 1 hora
	Subcategoria corrosiva 1B	> 3 minutos/ ≤ 1 hora	≤ 14 dias
	Subcategoria corrosiva 1C	> 1 hora/ 4 horas	≤ 14 dias

[1] *"Derivado ácido" é uma designação de classe não específica e é amplamente definido como um ácido produzido a partir de uma substância química, seja diretamente ou por modificação ou substituição parcial. Esta classe inclui anidridos, halo ácidos, sais e outros tipos de produtos químicos.*

7. Uma limitação do método de teste de referência validado[7] é que muitas substâncias químicas não corrosivas, e algumas substâncias químicas corrosivas, podem não se qualificar para testes, com base nos resultados do teste de compatibilidade inicial (ver parágrafo 13). Substâncias químicas aquosas, com pH na faixa de 4,5 a 8,5, muitas vezes não se qualificam para testes; no entanto, 85% das substâncias químicas testadas nessa faixa de pH não foram corrosivas em testes em animais[7]. Os métodos de teste de membrana de barreira *in vitro* podem ser utilizados para testar sólidos (solúveis ou insolúveis em água), líquidos (aquosos ou não aquosos) e emulsões. No entanto, as substâncias químicas de teste que não causam alteração detectável no teste de compatibilidade (isto é, alteração de cor no Sistema de Detecção Química do método de teste de referência validado) não podem ser testadas com o método de membrana de barreira e devem ser testadas usando-se outros métodos de teste.

PRINCÍPIO DO TESTE

8. O sistema de teste compreende dois componentes: uma biobarreira macromolecular sintética e um sistema de detecção química (CDS); este método de ensaio detecta, através da membrana de barreira CDS, os danos causados por substâncias químicas corrosivas após a aplicação da substância química em teste, na superfície da membrana de barreira sintética macromolecular[7], presumivelmente, pelo mesmo mecanismo de corrosão que opera na pele viva.

9. A penetração através da membrana de barreira (ou ruptura) pode ser medida por um número de procedimentos ou CDS, incluindo uma mudança na cor de um corante indicador de pH ou em alguma outra propriedade da solução indicadora abaixo da barreira.

10. A membrana de barreira deve ser determinada como sendo válida, isto é, relevante e confiável, para seu uso pretendido. Isto inclui assegurar que diferentes preparações são consistentes em relação às propriedades de barreira, capazes de manter uma barreira contra substâncias químicas não-corrosivas, capazes de categorizar as propriedades corrosivas de substâncias químicas nas várias subcategorias de corrosividade do GHS da ONU[1]. A classificação atribuída baseia-se no tempo que uma substância química leva para penetrar através da membrana de barreira até a solução indicadora.

DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA

11. Antes do uso rotineiro do método de teste de membrana de barreira *in vitro*, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, ao classificar corretamente as doze Substâncias de Proficiência recomendadas na tabela 2. Em situações nas quais uma substância listada não esteja disponível ou quando seja justificável, outra substância, para a qual estejam disponíveis dados de referência adequados *in vivo* e *in vitro* (por exemplo, da lista de substâncias químicas de referência[10]), pode ser utilizada, desde que sejam aplicados os mesmos critérios de seleção descritos na tabela 1.

Tabela 2: Substâncias de Proficiência[1]

Substância [2]	CASRN	Classe Química	Sub categoria UN GHS *in vivo*	Subcategoria UN GHS *in vitro*
Di-hidrato de trifluoreto de boro	13319-75-0	Ácido inorgânico	1A	1A
Ácido nítrico	7976-37-2	Ácido inorgânico	1A	1A
Pentacloreto de fósforo	10026-13-8	Precursor de ácido inorgânico	1A	1A
Cloreto de valeril	638-29-9	Cloreto de Ácido	1B	1B
Hidróxido de Sódio	1310-73-2	Base inorgânica	1B	1B
1- (2-aminoetil) piperazina	140-31-8	Aminas alifáticas	1B	1B
Cloreto de benzenossulfonilo	98-09-9	Cloreto de Ácido	1C	1C
N, N-Dimetil benzilamina	103-83-3	Anilinas	1C	1C
Tetraetilenopentamina	112-57-2	Aminas alifáticas	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenóis	NC	NC
Acrilato de nonil	2664-55-3	Acrilatos/ metacrilatos	NC	NC
Bicarbonato de sódio	144-55-8	Sais inorgânicos	NC	NC

[1]As doze substâncias listadas acima contêm três substâncias de cada uma das três subcategorias do GHS da ONU para substâncias corrosivas e três substâncias não-corrosivas que estão disponíveis em fornecedores comerciais; a subcategoria GHS da ONU é baseada nos resultados de testes in vivo de alta qualidade. Estas substâncias são retiradas da lista de 40 substâncias de referência, incluídas na lista mínima de substâncias químicas identificadas por demonstrar a exatidão e confiabilidade dos métodos de ensaio estrutural e funcionalmente semelhantes ao método validado de ensaio de referência, e foram selecionadas da referência de 163 substâncias químicas originalmente utilizadas para validar o método de teste de referência (Corrositex®)[7,10,14]. O objetivo deste processo de seleção era incluir, na medida do possível, substâncias químicas que: representassem a faixa de respostas de corrosividade (não-corrosivos; corrosivos dos Grupos de Embalagem I, II e III da ONU) que o método de teste de referência validado é capaz de medir ou prever; foram representativos das classes químicas utilizadas durante o processo de validação; tem estruturas químicas que foram bem definidas; induzem resultados reproduzíveis no método de teste de referência validado; resultados definitivos induzidos no teste de referência in vivo; estavam comercialmente disponíveis; e não estavam associados a custos proibitivos de descarte[14].

[2]Substâncias testadas puras ou com pureza próxima a 90%.

[3]Os grupos de embalagem da ONU correspondentes são I, II e III, respectivamente, para as Subcategorias 1A, 1B e 1C do GHS da ONU.

NC: Não-corrosivo.

PROCEDIMENTO

12. Os parágrafos seguintes descrevem os componentes e os procedimentos de um método de teste de membrana de barreira artificial para avaliação de corrosividade[7,15], com base no VRM atual, ou seja, o Corrositex® comercialmente disponível. A membrana de barreira de membrana e as soluções de compatibilidade/indicador e categorização podem ser construídas, preparadas ou obtidas comercialmente, como no caso do VRM Corrositex®. Um protocolo de método de teste de amostra para o método de teste de referência validado está disponível[7]. Os testes devem ser realizados à temperatura ambiente (17 a 25°C) e os componentes devem atender às seguintes condições:

Teste de Compatibilidade do Produto Químico

13. Antes do teste de membrana de barreira, é realizado um teste de compatibilidade para determinar se a substância química de teste é detectável pelo CDS. Se o CDS não detectar a substância química em estudo, o método de teste da membrana de barreira não é adequado para avaliar a potencial corrosividade dessa substância química em particular e deve ser utilizado um método de ensaio diferente. O CDS e as condições de exposição usadas para o teste de compatibilidade devem refletir a exposição no teste de membrana de barreira subsequente.

Teste de categoria de escala de tempo de teste de substâncias químicas

14. Se for apropriado para o método, uma substância química que tenha sido qualificada pelo teste de compatibilidade deve ser submetida a um teste de categoria por prazo, ou seja, um teste de triagem para distinguir entre ácidos ou bases fortes e fracos. Por exemplo, no método de teste de referência validado, um teste de categorização por prazo é usado para indicar qual dos dois cronogramas deve ser usado com base na detecção de reserva ácida ou alcalina significativa. Devem ser utilizados dois prazos de avanço diferentes para determinar a corrosividade e a subcategoria de corrosividade cutânea UN GHS, com base na reserva ácida ou alcalina da substância química em estudo.

Componentes do Método de Teste de Membrana de Barreira

Membrana de Barreira

15. A membrana de barreira consiste em dois componentes: um gel aquoso macromolecular proteico e uma membrana de suporte permeável. O gel proteico

deve ser impermeável a líquidos e sólidos, mas pode ser corrosível e permeável. A membrana de barreira totalmente construída deve ser armazenada sob condições pré-determinadas, que impeçam a deterioração do gel – como secagem, crescimento microbiano, deslocamento, fissuração –, o que degradaria o seu desempenho. O período de armazenamento aceitável deve ser determinado e as preparações de membrana de barreira não devem ser usadas após esse período.

16. A membrana de suporte permeável fornece suporte mecânico ao gel proteico durante o processo de gelificação e exposição à substância química em teste. A membrana de suporte deve impedir a flacidez ou o deslocamento do gel e ser prontamente permeável a todas as substâncias químicas de teste.

17. O gel proteico, composto por proteína, queratina, colágeno ou misturas de proteínas, formando uma matriz de gel, serve como o alvo para a substância química de teste. O material proteico é colocado na superfície da membrana de suporte e deixado para gelificar antes de se colocar a membrana de barreira sobre a solução indicadora. O gel proteico deve ter espessura e densidade iguais, sem bolhas de ar ou defeitos que possam afetar sua integridade funcional.

Sistema de Detecção Química (CDS)

18. A solução indicadora, que é a mesma solução usada para o teste de compatibilidade, deve responder à presença de uma substância química em teste. Deve ser usado um corante indicador de pH ou uma combinação de corantes, por exemplo, cresol vermelho e laranja de metila, que mostrará uma mudança de cor, em resposta à presença da substância química em teste. O sistema de medição pode ser visual ou eletrônico.

19. Os sistemas de detecção desenvolvidos para indicar a passagem da substância química em teste através da membrana de barreira devem ser avaliados quanto à sua relevância e sua confiabilidade, a fim de demonstrar a gama de substâncias químicas que podem ser detectadas e os limites quantitativos de detecção.

DESEMPENHO DO TESTE

Montagem dos Componentes do Método de Teste

20. A membrana de barreira é posicionada em um frasco (ou tubo) contendo a

solução indicadora, de modo que a membrana de suporte esteja em contato total com a solução indicadora e sem a presença de bolhas de ar. Deve-se ter cuidado para garantir que a integridade da barreira seja mantida.

Aplicação do teste químico

21. Uma quantidade adequada da substância química em teste, por exemplo, 500*µ*l de um líquido ou 500mg de um sólido finamente pulverizado[7], é cuidadosamente colocada em camadas na superfície superior da membrana de barreira e distribuída uniformemente. Número apropriado de replicados, por exemplo, quatro[7], é preparado para cada substância química de teste e seus controles correspondentes (ver parágrafos 23 a 25). O tempo de aplicação da substância química em teste na barreira de membrana é registrado. Para garantir que os tempos curtos de corrosão sejam registrados com precisão, os tempos de aplicação da substância química em teste nos frascos replicados são escalonados.

Medição de Penetrações na Membrana de Barreira

22. Cada frasco é adequadamente monitorizado, sendo registrado o momento da primeira alteração na solução indicadora, isto é, penetração através da barreira, e sendo determinado o tempo decorrido entre a aplicação e a penetração através da membrana de barreira.

Controles

23. Em testes que envolvam o uso de um veículo ou de solvente com a substância química em teste, o veículo ou o solvente deve ser compatível com o sistema de membrana de barreira; ou seja, não deve alterar a integridade do sistema de membrana de barreira e não deve mudar a corrosividade da substância química em teste. Quando aplicável, o controle do solvente (ou do veículo) deve ser testado concomitantemente com a substância química em teste, para demonstrar a compatibilidade do solvente com o sistema de membrana de barreira.

24. Um controle positivo (corrosivo) com atividade de corrosividade intermediária, por exemplo, 110 ± 15mg de hidróxido de sódio (UN GHS Corrosivo Subcategoria 1B)[7], deve ser testado simultaneamente com a substância química em estudo, para se avaliar se o sistema está ocorrendo de maneira aceitável. Um segundo controle positivo, da mesma classe química do produto em teste, pode ser útil para avaliar o potencial de corrosividade relativa de um produto corrosivo.

Deve(m) ser selecionado(s) controle(s) positivo(s) que seja(m) intermediário(s) em sua corrosividade (por exemplo, UN GHS Subclasse 1B), para detectar mudanças no tempo de penetração, que podem ser inaceitavelmente maiores ou menores do que o valor de referência estabelecido, indicando assim que o sistema de teste não está funcionando corretamente. Para este propósito, elemento extremamente corrosivo (UN GHS Subcategoria 1A) ou substâncias químicas não-corrosivas são de utilidade limitada. Uma substância química corrosiva da subcategoria 1B do GHS da ONU permitiria a detecção de um tempo de ruptura muito rápido ou muito lento. Um corrosivo fraco (Subcategoria 1C do GHS do UN) pode ser empregado como controle positivo para medir a capacidade do método de teste de distinguir consistentemente entre substâncias químicas fracamente corrosivas e não-corrosivas. Independentemente da abordagem utilizada, uma faixa de resposta de controle positiva aceitável deve ser desenvolvida com base na faixa histórica de tempos de avanço para o(s) controle(s) positivo(s) empregado(s), como a média ± 2-3 desvios-padrão. Em cada estudo, o tempo de ruptura exato deve ser determinado para o controle positivo, de modo que os desvios fora da faixa aceitável possam ser detectados.

25. Um controle negativo (não-corrosivo), por exemplo, 10% de ácido cítrico, 6% de ácido propiônico[7], também deve ser testado concomitantemente ao teste químico, como outra medida de controle de qualidade para demonstrar a integridade funcional da membrana de barreira.

Critérios de Aceitação do Estudo

26. De acordo com os parâmetros de tempo, estabelecidos para cada uma das subcategorias de corrosividade do GHS da ONU, o intervalo (em minutos) decorrido entre a aplicação de uma substância química à membrana de barreira e a penetração através da barreira é usado para prever a corrosividade da substância química em teste. Para um estudo ser considerado aceitável; o controle positivo concorrente deve dar o tempo de resposta de penetração esperado (por exemplo, 8-16 minutos de tempo de ruptura para o hidróxido de sódio, se utilizado como controle positivo); o controle negativo concorrente não deve ser corrosivo e incluído; o controle de solvente concorrente não deve ser corrosivo e nem deve alterar o potencial de corrosividade da substância química em teste. Antes do uso rotineiro de um método de teste que atenda a esta Diretriz, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, usando as doze substâncias recomendadas na

tabela 2. Para novos métodos de teste "me too" desenvolvidos sob esta Diretriz, que sejam estrutural e funcionalmente similares ao método de teste de referência validado[14], os padrões de desempenho pré-definidos devem ser usados para demonstrar a confiabilidade e a precisão do novo método de teste antes de seu uso para testes regulatórios[10].

Interpretação de Resultados e Classificação de Corrosividade das Substâncias Químicas de Teste

27. O tempo (em minutos) decorrido entre a aplicação da substância química em teste à membrana de barreira e a penetração através da barreira é utilizado para classificar a substância química em termos de subcategorias corrosivas do GHS da ONU[1] e, se aplicável, do Grupo ONU de Embalagens[16]. Os valores do tempo de corte para cada uma das três subcategorias corrosivas são estabelecidos para cada método de teste proposto. As decisões finais sobre os horários limites devem considerar a necessidade de minimizar a subclassificação do risco de corrosão (ou seja, falsos negativos). Na presente Diretriz, os tempos de corte do Corrositex®, conforme descrito na tabela 3, devem ser usados, pois representam o único método de teste, atualmente, dentro da diretriz de teste[7].

Tabela 3. Modelo de previsão do Corrositex®

Tempo médio de penetração		**Previsão UN GHS [3]**
Produto químico de teste categoria 1[1] (determinado pelo teste de categorização do método)	**Produto químico de teste categoria 2 [2] (determinado pelo teste de categorização do método)**	
0 a 3 min	0 a 3 min	Corrosivo, subcategoria 1A opcional
>3 até 60 min	>3 até 30 min	Corrosivo, subcategoria 1B opcional
>60 até 240 min	>30 até 60 min	Corrosivo, subcategoria 1C opcional
> 240 min	> 60 min	Não-corrosivo

[1] Teste de substâncias químicas com alta reserva ácida/ alcalina[6]

[2] Teste de substâncias químicas com baixa reserva ácida/ alcalina[6]

[3] UN GHS As subcategorias 1A, 1B e 1C correspondem aos grupos de embalagem I, II e III da ONU, respectivamente.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

28. O tempo (em minutos) decorrido entre a aplicação e a penetração da barreira para a substância química em teste e o(s) controle(s) positivo(s) devem ser relatados em forma de tabela como dados replicados individuais, assim como ± desvio padrão para cada ensaio.

Relatório de teste

29. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

Substâncias químicas de teste e de controle:

- Substância monoconstituinte: identificação química, como nome IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas conforme apropriado e praticamente viável, etc.;
- Substância multiconstituinte, UVCB e misturas: caracterizada tanto quanto possível por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes;
- Aparência física, solubilidade em água e propriedades físico-químicas relevantes adicionais;
- Fonte, número do lote, se disponível;
- Tratamento do produto químico/ substância de controle antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem);
- Estabilidade da substância química em estudo, data limite de uso ou data para reanálise, se conhecida;
- Condições de armazenamento.

Veículo

- Identificação, concentração (quando apropriado), volume utilizado;
- Justificativa para a escolha do veículo.

Modelo de barreira de membrana in vitro e protocolo usado, incluindo a demonstração da precisão e confiabilidade.

Condições de teste:

- Descrição do aparelho e procedimentos de preparação utilizados;

- Fonte e composição da membrana de barreira *in vitro* utilizada;
- Composição e propriedades da solução indicadora;
- Método de detecção;
- Volume das substâncias de teste e de controle;
- Número de replicados;
- Descrição e justificativa do teste de categorização por prazo;
- Método de aplicação;
- Períodos de observação;
- Descrição dos critérios de avaliação e classificação aplicados;
- Demonstração de proficiência na realização do método de teste antes do uso rotineiro no teste das substâncias químicas de proficiência.

Resultados

- Tabulação de dados brutos individuais de amostras de teste e controle para cada réplica;
- Descrições de outros efeitos observados;
- A classificação derivada com referência ao modelo de previsão/ critérios de decisão utilizados.

Discussão dos Resultados

Conclusões

LITERATURA

(1) United Nations (UN).(2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Availableat: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) OECD.(2015).Guideline for Testing of Chemicals. (Nº 404.): AcuteDermalIrritation, Corrosion. Organisation for EconomicCooperation and Development, Paris.

(3) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 431.): In Vitro Skin Model. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 430.): In Vitro Skin

Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Guidance Documenton Integrated Approaches to Testing and Assessment of SkinIrritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (Nº 203.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology In Vitro 12, 483-524.

(7) ICCVAM. (1999). Corrositex®. An In Vitro Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (Nº 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. In vitro Skin Toxicology- Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(9) OECD. (2005). Guidance Documenton the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assesment (Nº 34.).

(10) Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) ECVAM. (2001). Statementon the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT. (2002). Exemption DOT-E-10904 (FifthRevision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT. Available at: [http://www.hazmat.dot.gov/exemptions/E10904.pdf].

(13) OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (Nº 439.). In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) ICCVAM. (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for In Vitro Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication Nº 04-4510. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf].

(15) U.S. EPA. (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Available at: [http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf].

(16) United Nations (UN). (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.p df]

ANEXO 1

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de relevância. O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância" para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste[9].

Substância química: significa um produto químico ou mistura.

Sistema de Detecção Química (CDS): um sistema de medição visual ou eletrônico com uma solução indicadora que responde à presença de uma substância química de teste, por exemplo, por uma mudança no corante indicador de pH, ou combinação de corantes, que mostrará uma mudança de cor em resposta à presença da substância química em estudo ou por outros tipos de reações químicas ou eletroquímicas.

Concordância: esta é uma medida do desempenho do método para métodos de teste que fornecem um resultado categórico e é um aspecto de relevância. O termo é algumas vezes usado de forma intercambiável com precisão e é definido como a proporção de todas as substâncias químicas testadas que são classificadas corretamente como positivas ou negativas. A concordância é altamente dependente da prevalência de positivos nos tipos de substâncias químicas testadas[9].

GHS (Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas): um sistema propondo a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas) de acordo com os tipos e níveis padronizados de riscos físicos, de saúde e ambientais e endereçando os elementos de comunicação corres-

pondentes, tais como pictogramas, palavras, declarações de perigo, declarações de precaução e fichas de dados de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o ambiente[1].

AITA: Abordagem Integrada em Teste e Avaliação.

Mistura: significa uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem.

Substância monoconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, na qual um constituinte principal está presente em pelo menos 80% (p/p).

Substância multiconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que mais de um constituinte principal está presente numa concentração $\geq$10% (p/p) e $<$80% (p/p). Uma substância multiconstituinte é o resultado de um processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela mistura de duas ou mais substâncias sem reação química. Uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

NC: Não-corrosivo.

Padrões de desempenho: padrões, baseados em um método de teste validado, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método de teste proposto que é mecanica e funcionalmente similar. Incluem-se: (i) componentes essenciais do método de teste; (ii) uma lista mínima de Substâncias Químicas de Referência selecionados dentre as substâncias químicas utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de teste validado; e (iii) os níveis semelhantes de confiabilidade e precisão, com base no que foi obtido para o método de teste validado, que o método de teste proposto deve demonstrar quando avaliado usando a lista mínima de Substâncias Químicas de Referência[9].

Relevância: descrição da relação do método de teste para o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a maneira em que o método de teste mede ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[9].

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado replicavelmente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, quando realizado usando o mesmo protocolo. É avaliado pelo cálculo da reprodutibilidade intra e interlaboratorial[9].

Sensibilidade: a proporção de todas as substâncias químicas positivas/ ativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[9].

Corrosão cutânea in vivo: a produção de danos irreversíveis da pele; isto é, necrose visível através da epiderme e na derme, após a aplicação de uma substância química teste por até quatro horas. As reações corrosivas são caracterizadas por úlceras, sangramento, feridas sangrentas e, ao final da observação, aos 14 dias, por descoloração devido ao branqueamento da pele, áreas completas de alopecia e cicatrizes. A histopatologia deve ser considerada para avaliar lesões questionáveis.

Especificidade: a proporção de todas as substâncias químicas negativas/ inativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[9].
Substância: significa os elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo usado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou alteração da sua composição.

Substância química de teste: significa o que está sendo testado.

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

Adotado: 28 de Julho de 2015

Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 439

Irritação cutânea in vitro: método de reconstrução da epiderme humana

INTRODUÇÃO

1. A irritação cutânea refere-se à produção de danos reversíveis na pele após a aplicação de uma substância química em teste, durante até 4 horas [conforme definido pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) das Nações Unidas][1]. Esta diretriz fornece um procedimento *in vitro* que pode ser usado para a identificação de substâncias químicas irritantes (substâncias e misturas), de acordo com a categoria 2[1-2] do GHS da ONU. Nos países membros ou regiões que não adotarem a Categoria 3 GHS opcional da ONU (irritantes suaves), esta diretriz também pode ser usada para identificar substâncias químicas não classificadas. Portanto, dependendo do esquema regulatório e do sistema de classificação em uso, esta Diretriz pode ser usada para determinar a irritação cutânea por substâncias químicas, tanto como um teste independente para substituir testes de irritação cutânea *in vivo*, quanto como para a substituição parcial de um teste dentro de uma estratégia de avaliação[3].

2. A avaliação da irritação cutânea envolve tipicamente o uso de animais de laboratório [OECD DIRETRIZ 404; originalmente adotada em 1981 e revisada em 1992, 2002 e 2015][4]. Para o teste de corrosividade, três métodos de teste *in vitro* validados foram adotados como DIRETRIZES 430, 431 e 435[5-7] da OECD. Um documento sobre Abordagens Integradas de Testes e Avaliação (AITA) para corrosão e irritação cutânea descreve vários módulos que agrupam fontes de informação e ferramentas de análise, fornecendo orientações sobre: (i) como integrar e usar dados de teste e não-teste existentes para avaliação dos potenciais de irritação e corrosão cutâneas de substâncias químicas e (ii) propõe uma abordagem integrada, quando são necessários mais testes[3].

3. Esta diretriz aborda a irritação cutânea no ponto final da saúde humana. Baseia-se no sistema de teste *in vitro* da epiderme humana reconstruída (RhE, em inglês), que imita de perto as propriedades bioquímicas e fisiológicas das camadas superiores da pele humana, isto é, a epiderme. O sistema de teste RhE utiliza queratinócitos não transformados, derivados de humanos, como fonte celular para reconstruir um modelo epidérmico com histologia e citoarquitetura representativas. Os Padrões de

Desempenho (PD) estão disponíveis para facilitar a validação e avaliação de métodos de teste, similares e modificados, baseados em RhE, de acordo com os princípios do Documento de Orientação No. 34[8-9]. Esta diretriz foi originalmente adotada em 2010, atualizada em 2013, para incluir métodos de teste adicionais usando os modelos RhE, e modernizada em 2015 incluindo o uso de um procedimento alternativo para medir a viabilidade ao documento de orientação da AITA.

4. Os estudos de pré-validação, otimização e validação foram concluídos para quatro métodos de ensaio *in vitro* comercialmente disponíveis[10-28] com base no sistema de teste de RhE (sensibilidade de 80%, especificidade de 70% e precisão de 75%). Esses quatro métodos de teste estão incluídos nesta diretriz e estão listados no anexo 2, que também fornece informações sobre o tipo de estudo usado para validar os respectivos métodos de teste. Conforme observado no anexo 2, o Método de Referência Validado (MRV) foi utilizado para desenvolver a presente diretriz e os Padrões de Desempenho[8].

5. A Aceitação Mútua de Dados (AMD) somente será garantida para os métodos de teste, validados, de acordo com os Padrões de Desempenho[8], se esses métodos tiverem sido revisados e adotados pela OECD. Os métodos de testes incluídos nesta diretriz podem beneficiar a Aceitação Mútua de Dados, uma vez que podem ser utilizados indiscriminadamente, para atender os requisitos necessários de países que se utilizam de testes *in vitro* para irritação cutânea.

6. As definições dos termos usados neste documento são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

7. Uma limitação da diretriz, como demonstrado pelo estudo completo de validação prospectiva que avalia e caracteriza os métodos de teste de RhE[16], é não permitir a classificação de substâncias químicas na Categoria 3 da UN GHS (irritantes suaves)[1]. Assim, o esquema regulatório nos países membros decidirá como esta diretriz será usada. Para uma avaliação completa dos efeitos cutâneos após uma única exposição, o Documento de Orientação No. 203 sobre Abordagens Integradas para Testes de Avaliação deve ser consultado[3]. É reconhecido que o uso da pele humana está sujeito a considerações e condições éticas nacionais e internacionais.

8. Esta diretriz aborda a irritação cutânea no ponto de vista da saúde humana. Embora esta diretriz não forneça informações adequadas sobre a corrosão cutânea, deve-se observar que a Diretriz 431 da OECD sobre a corrosão cutânea é baseada no mesmo sistema de teste RhE, mesmo usando outro protocolo[6]. Esta diretriz é

baseada em modelos RhE usando queratinócitos humanos, que portanto, representam *in vitro*, o órgão-alvo de interesse. Além disso, cobre diretamente a etapa inicial do mecanismo de ação inflamatório (dano celular e tecidual que resulta em trauma localizado) que ocorre durante a irritação *in vivo*. Uma ampla gama de substâncias químicas foi testada na validação subjacente a esta diretriz e o banco de dados do estudo de validação, totalizou 58 substâncias químicas[16;18;23]. A diretriz é aplicável a sólidos, líquidos, semi-sólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não aquosos; os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Sempre que possível, os sólidos devem ser moídos até um pó fino antes da aplicação; nenhum outro pré-tratamento da amostra é necessário. Gases e aerossóis ainda não foram avaliados em um estudo de validação[29]. Embora seja concebível que possam ser testados usando a tecnologia RhE, a diretriz atual não permite testes de gases e aerossóis.

9. Antes de usar a diretriz em uma mistura para gerar dados com uma finalidade regulatória, deve-se considerar se e porque ela pode fornecer resultados adequados para este propósito. Tais considerações não são necessárias quando há uma exigência regulamentar para o teste da mistura. Há casos nos quais se podem demonstrar evidências de não aplicabilidade da diretriz para misturas, para uma categoria específica, (por exemplo, seguindo uma estratégia como a proposta em Eskes *et al*. 2012[30]). Nestes casos, não se deve aplicar a diretriz, devido ao fato de misturas envolverem um amplo espectro de categorias e composições e, porque, apenas informações limitadas estão disponíveis para o teste de misturas. Cuidados semelhantes devem ser tomados no caso de classes químicas específicas ou propriedades físico-químicas não aplicáveis à diretriz atual.

10. Testes químicos absorvendo luz na mesma faixa do MTT formazan e substâncias químicas de teste capazes de reduzir diretamente o corante vital MTT (para MTT formazan) podem interferir nas medições de viabilidade celular e precisam do uso de controles adaptados para correções (ver parágrafos 28-34).

11. Quando a classificação é inequívoca, um único ensaio, composto por três tecidos replicados, deve ser suficiente para uma substância química em estudo. No entanto, nos casos de resultados limítrofes, como medições replicadas não concordantes e/ou percentual médio de viabilidade igual a 50 ±5%, uma segunda execução deve ser considerada, assim como uma terceira, no caso de resultados discordantes entre as duas primeiras.

PRINCÍPIO DO TESTE

12. A substância química de teste é aplicada topicamente a um modelo tridimen-

sional de RhE, constituído por queratinócitos epidérmicos não transformados, derivados de humanos, que foram cultivados para criar um modelo de multicamadas altamente diferenciado da epiderme humana. Consiste em camadas basais, espinhosas e granulares organizadas, e camadas lipídicas lamelares intercelulares, contendo camadas intercelulares que representam as principais classes lipídicas análogas às encontradas *in vivo*.

13. A irritação cutânea induzida por substâncias químicas, manifestada principalmente por eritema e edema, é o resultado de uma cascata de eventos que começam com a penetração das substâncias químicas, através do estrato córneo, onde podem danificar as camadas subjacentes de queratinócitos e outras células cutâneas. As células danificadas podem liberar mediadores inflamatórios ou induzir uma cascata inflamatória, que também atua sobre as células da derme, particularmente as células estromais e endoteliais dos vasos sanguíneos. É a dilatação e o aumento da permeabilidade das células endoteliais que produzem o eritema e o edema observados[29]. Os métodos de teste baseados em RhE, na ausência de qualquer vascularização no sistema de teste *in vitro*, medem os eventos de iniciação na cascata, por exemplo dano celular/ tecidual[16-17], utilizando leituras de viabilidade celular.

14. A viabilidade celular em modelos de RhE é medida por conversão enzimática do corante vital MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo; CAS número 298-93-1], num sal de azul de formazan, que é quantitativamente medido após a remoção de tecidos[31]. As substâncias químicas irritantes são identificadas por sua capacidade de diminuir a viabilidade celular abaixo dos limites definidos (isto é, $\leq$50%, para a categoria 2 do GHS da ONU). Dependendo do esquema regulamentar e da aplicabilidade da diretriz, as substâncias químicas de teste, que produzem viabilidade celular acima do limiar definido, podem ser considerados não irritantes (ou seja,$>$50%, Sem categoria UN GHS).

DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA

15. Antes do uso rotineiro de qualquer um dos quatro métodos de teste validados que seguem esta diretriz (anexo 2), os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, usando as dez Substâncias de Proficiência listadas na tabela 1. Em situações onde, por exemplo, uma substância da lista não estiver disponível, pode ser utilizada outra para a qual estejam disponíveis dados de referência *in vivo* e *in vitro* adequados, (por exemplo, a partir da própria lista de substâncias químicas de referência[8]), desde

que sejam aplicados os mesmos critérios de seleção descritos na tabela 1. A utilização de uma substância de proficiência alternativa deve ser justificada.

16. Como parte dos testes de proficiência, recomenda-se que os usuários verifiquem as propriedades de barreira dos tecidos após o recebimento, conforme especificado pelo produtor do modelo de RhE. Isso é particularmente importante se os tecidos forem transportados por longos períodos ou grandes distâncias. Uma vez que um método de teste tenha sido estabelecido com sucesso e a proficiência em seu uso tenha sido adquirida e demonstrada, tal verificação não será necessária rotineiramente. No entanto, ao usar um método de teste rotineiramente, recomenda-se continuar a avaliar as propriedades de barreira em intervalos regulares.

Tabela 1: Substâncias de Proficiência[1]

Substância	**CASNR**	**Escore *in vivo*[2]**	**Estado físico**	**Categoria do GHS UN**
	SUBSTÂNCIAS NÃO CLASSIFICADAS (Sem Categoria no GHS UN)			
Ácido acético naftaleno	86-87-3	0,0	Sólido	Sem Categoria
Isopropanol	67-63-0	0.3	Líquido	Sem Categoria
Estearato de metilo	112-61-8	1.0	Sólido	Sem Categoria
Butirato de heptilo	5870-93-9	1,7	Líquido	Sem Categoria (opcional Categoria 3)[3]
Salicilato de hexila	6259-76-3	2.0	Líquido	Sem Categoria (opcional Categoria 3)[3]
	SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS (Categoria 2 do GHS UN)			
Aldeído de ciclâmen	103-95-7	2.3	Líquido	Categoria 2
1-bromohexano	111-25-1	2.7	Líquido	Categoria 2
Hidróxido de potássio (5% aq.)	1310-58-3	3.0	Líquido	Categoria 2
1-metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3.3	Sólido	Categoria 2
Heptanal	111-71-7	3.4	Líquido	Categoria 2

[1] As Substâncias de Proficiência são um subconjunto das substâncias utilizadas no estudo de validação e a seleção é baseada nos seguintes critérios: (i) as substâncias químicas estão comercialmente disponíveis; (ii) elas são representativas de toda a gama de escores de irritabilidade de Draize (de não irritante a forte irritante); (iii), eles têm uma estrutura química bem definida; (iv) são representativas da funcionalidade química utilizada no processo de

validação; (v) forneceram resultados reprodutíveis *in vitro* em múltiplos laboratórios e múltiplos testes; (vi) foram corretamente previstos *in vitro* e (vii) não estão associados a um perfil extremamente tóxico (por exemplo, carcinogênico ou tóxico para o sistema reprodutivo) e não estão associados a custos proibitivos de descarte.

[2] Pontuação *in vivo* de acordo com a diretriz 404 da OECD[(4)].

[3] Sob esta diretriz, a Categoria 3 do GHS da ONU (irritantes suaves)[(1)] é considerada como "Sem Categoria".

PROCEDIMENTO

17. O que se segue é uma descrição dos componentes e procedimentos de um método de teste de RhE para avaliação da irritação cutânea (ver também o anexo 3 para os parâmetros relacionados com cada método de teste). Estão disponíveis os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) para os quatro métodos de teste que estão em conformidade com esta diretriz[(32-35)].

COMPONENTES DO MÉTODO DE TESTE RhE

Condições Gerais

18. Os queratinócitos humanos não transformados devem ser usados para reconstruir o epitélio. Múltiplas camadas de células epiteliais viáveis (camada basal, estrato espinhoso, estrato granuloso) devem estar presentes sob um estrato córneo funcional. O estrato córneo deve ter multicamadas, contendo o perfil lipídico essencial para produzir uma barreira funcional, com robustez para resistir à penetração rápida de substâncias químicas citotóxicas de referência, como dodecil-sulfato de sódio (SDS) ou Triton X-100. A função de barreira deve ser demonstrada e pode ser avaliada tanto pela determinação da concentração na qual uma substância química de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50% (IC_{50}), após um tempo de exposição fixo, quanto pela determinação do tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade em 50% (ET_{50}), mediante a aplicação da substância química de referência em uma concentração fixa e especificada. As propriedades de contenção do modelo RhE devem impedir a passagem de material ao redor do estrato córneo para o tecido viável, o que levaria a uma modelagem inadequada da exposição cutânea. O modelo RhE deve estar livre de contaminação por bactérias, vírus, micoplasmas ou fungos.

Condições funcionais

Viabilidade

19. O ensaio usado para quantificar a viabilidade é o teste MTT[31]. As células viáveis da construção de tecido RhE podem reduzir o corante MTT vital num precipitado de MTT azul de formazan, que é extraído do tecido usando isopropanol (ou um solvente semelhante). A densidade óptica (DO) do solvente de extração, por si só, deve ser suficientemente pequena, isto é, DO <0,1. O MTT formazan extraído pode ser quantificado, usando uma medição de absorbância padrão (AP) ou um procedimento de espectrofotometria por HPLC/ UPLC[36]. Os usuários do modelo RhE devem garantir que cada lote do modelo RhE usado atenda aos critérios definidos para o controle negativo. O fabricante/ fornecedor do modelo RhE estabelecerá uma faixa de aceitabilidade (limites superior e inferior) para os valores de DO de controle negativo (nas condições do Método de Teste de Irritação cutânea). As faixas de aceitabilidade para os quatro métodos de teste de RhE validados, incluídos nesta diretriz, são dadas na tabela 2. O usuário de espectrofotometria por HPLC/ UPLC deve usar as faixas de DO de controle negativo fornecidas na tabela 2, como o critério de aceitação para o controle negativo. Deve ser documentado que os tecidos tratados com o controle negativo são estáveis em cultura (proporcionam medições de viabilidade semelhantes) durante o período de exposição ao teste.

Tabela 2: Intervalos de aceitabilidade para os valores de densidade ótica (DO) de controle negativo. Métodos de ensaio incluídos nesta diretriz.

	Limite de aceitação inferior	**Limite de aceitação superior**
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0.7	≤ 2.5

Função de barreira

20. O estrato córneo e a sua composição lipídica devem ser suficientes para resistir à rápida penetração de substâncias químicas citotóxicas de referência, como o SDS ou Triton X-100, como estimado por IC_{50} ou ET_{50} (tabela 3).

Morfologia

21. O exame histológico do modelo de ETR deve ser fornecido, demonstrando estrutura semelhante à epiderme humana (incluindo estrato córneo de múltiplas camadas).

Reprodutibilidade

22. Os resultados dos controles positivos e negativos do método de teste devem demonstrar a reprodutibilidade ao longo do tempo.

Controle de qualidade (CQ)

23. O modelo RhE só deve ser utilizado se o fabricante/ fornecedor demonstrar que cada lote satisfaz os critérios de liberação definidos, entre os quais os mais relevantes são os de viabilidade (parágrafo 19), de função barreira (parágrafo 20) e de morfologia (parágrafo 21). Esses dados devem ser fornecidos aos usuários do método de teste, para que eles possam incluir essas informações no relatório. Uma faixa de aceitabilidade (limite superior e inferior) para o IC_{50} ou o ET_{50} deve ser estabelecida pelo fabricante/ fornecedor do modelo RhE. Somente resultados produzidos com tecidos qualificados podem ser aceitos para uma previsão confiável da classificação de irritação. Os intervalos de aceitabilidade para os quatro métodos de teste incluídos nesta diretriz são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Critérios CQ para liberação do lote dos métodos de teste incluídos nesta diretriz

	Limite de aceitação inferior	**Limite de aceitação superior**
EpiSkin™ (SM) tratamento de 18 horas com SDS[32]	IC_{50} = 1.0 mg/ml	IC_{50} = 3.0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% de Triton X-100)[33]	ET_{50} = 4.0 h	ET_{50} = 8.7 h
SkinEthic™ RHE (1% de Triton X-100)[34]	ET_{50} = 4.0 h	ET_{50} = 10.0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (tratamento de 18 horas com SDS)[35]	IC_{50} = 1.4 mg/ml	IC_{50} = 4.0 mg/

Aplicação das Substâncias Químicas e de Controle de Teste

24. Devem ser utilizadas, pelo menos, três réplicas para cada substância química

em estudo e para os controles em cada execução. Tanto para substâncias químicas líquidas como sólidas, deve-se aplicar quantidade suficiente de substância química para cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando uma dose infinita, isto é, variando de 26 a 83μl/cm^2 ou mg/cm^2 (ver anexo 3). Para substâncias químicas sólidas, a superfície da epiderme deve ser umedecida com água deionizada ou destilada antes da aplicação, para melhorar o contato entre a substância química em teste e a superfície da epiderme. Sempre que possível, os sólidos devem ser testados como pó fino. Uma malha de náilon pode ser usada para ajudar na dispersão em alguns casos (ver anexo 3). No final do período de exposição, a substância química em estudo deve ser cuidadosamente lavada da superfície da epiderme com uma solução aquosa tamponada ou NaCl a 0,9%. Dependendo dos métodos de teste de RhE utilizados, o período de exposição varia entre 15 e 60 minutos e a temperatura de incubação entre 20 e 37°C. Estes períodos de exposição e temperaturas são otimizados para cada método de teste de RhE individualmente e representam as diferentes propriedades intrínsecas dos métodos de teste (por exemplo, função de barreira) (ver anexo 3).

25. Controle negativo (CN) e controle positivo (CP) devem ser usados em cada execução para demonstrar que a viabilidade (usando o CN), a função de barreira e a sensibilidade tecidual resultante (usando o CP) dos tecidos estão dentro de uma faixa de aceitação histórica definida. O CP sugerido é SDS aquoso a 5%. Os CN sugeridos são água ou solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Medidas de Viabilidade Celular

26. De acordo com o procedimento de teste, é essencial que a medição da viabilidade não seja realizada imediatamente após a exposição à substância química, mas após um período de incubação pós-tratamento, suficientemente longo, seguido por um enxágue do tecido em meio fresco. Este período permite a recuperação de efeitos citotóxicos fracos e o aparecimento de efeitos citotóxicos claros. Um período de incubação de 42 horas pós-tratamento foi considerado ideal durante a otimização de dois dos métodos de teste baseados em RhE subjacentes a esta diretriz [11-15].

27. O teste MTT é um método quantitativo padronizado que deve ser usado para medir a viabilidade celular sob esta diretriz. É compatível com o uso em uma construção de tecido tridimensional. A amostra de tecido é colocada em solução de MTT de concentração apropriada (por exemplo, 0,3-1mg/mL) durante 3 horas. O

MTT é convertido em azul de formazan pelas células viáveis. O precipitado azul de formazan é então extraído do tecido, usando um solvente (por exemplo, isopropanol, isopropanol ácido), e a concentração de formazan é medida determinando-se a DO a 570nm, usando uma passagem de banda de filtro máxima de ± 30nm ou um procedimento de espectrometria por HPLC/ UPLC (ver parágrafo 34)[36].

28. As propriedades ópticas da substância química em teste ou a sua ação química no MTT (por exemplo, substâncias químicas podem prevenir ou reverter à geração de cor, bem como causá-lo) podem interferir com o ensaio, levando a uma falsa estimativa de viabilidade. Isso pode ocorrer quando uma substância química específica não é completamente removida do tecido pela lavagem ou quando penetra na epiderme. Se uma substância química de teste atua diretamente no MTT (por exemplo, redutor MTT), é naturalmente colorida ou fica colorida durante o tratamento de tecidos, controles adicionais devem ser usados para detectar e corrigir interferência química de teste com a técnica de medição de viabilidade (ver parágrafos 29 e 33). A descrição detalhada de como corrigir a redução direta do MTT e as interferências por agentes corantes está disponível nos POPs para os quatro métodos de teste validados incluídos nesta diretriz[32-35].

29. Para identificar os redutores diretos de MTT, cada substância química de teste deve ser adicionada à solução de MTT recém-preparada. Se a mistura de MTT contendo a substância química de teste ficar azul/ roxa, presume-se que o teste químico reduz diretamente o MTT e deve ser realizada uma verificação funcional adicional nos tecidos RhE não viáveis, independentemente do uso da medição de absorbância padrão (AP) ou de um Procedimento de UPLC/ HPLC espectrofotometria. Esta verificação funcional adicional emprega tecidos mortos que possuem apenas atividade metabólica residual, mas absorvem a substância química em teste de maneira similar aos tecidos viáveis. Cada substância química de teste redutora de MTT é aplicada em, pelo menos, duas réplicas de tecidos mortos, que passam por todo o procedimento de teste para gerar uma redução de MTT não específica (NSMTT)[32-35]. Um único controle NSMTT é suficiente por ensaio químico, independentemente do número de testes/ execuções realizadas. A verdadeira viabilidade tecidual é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidual obtida com tecidos vivos, expostos ao redutor de MTT, menos a porcentagem de redução não específica de MTT, obtida com os tecidos mortos expostos ao mesmo redutor de MTT, calculado em relação ao controle negativo, executado simultaneamente ao teste a ser corrigido (% NSMTT).

30. Identificar possíveis interferências por substâncias químicas coloridas, substâncias químicas testadas que ficam coloridas quando em contato com água ou isopropanol, para decidir sobre a necessidade de controles adicionais, deve ser feita a análise espectral da substância química em teste (meio ambiente durante a exposição) e/ou isopropanol (solução extratora). Se a substância química em teste em água e/ou isopropanol absorver luz na faixa de 570 ±30nm, devem ser realizados controles adicionais de corantes ou, alternativamente, um procedimento de espectrofotometria por HPLC/ UPLC. Neste caso, esses controles não são necessários (ver parágrafos 33 e 34). Ao realizar a medição de absorbância padrão (AP), cada substância química interferente colorida é aplicada em, pelo menos, duas réplicas de tecido viáveis, que passam por todo o procedimento de teste, mas são incubadas com meio em vez de solução MTT, durante a etapa de incubação, para gerar um controle de cor específica (NSC_{living}). O controle NSC_{living} precisa ser realizado concomitantemente ao teste da substância química colorida e, no caso de testes múltiplos, um NSC_{living} de controle independente precisa ser realizado com cada teste efetuado (em cada execução) devido à variabilidade biológica inerente dos tecidos vivos. A verdadeira viabilidade tecidual é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidual obtida com tecidos vivos, expostos à substância química interferente e incubados com solução de MTT, menos a porcentagem de cor não específica obtida com tecidos vivos expostos à substância química interferente e incubados com meio sem MTT, executados simultaneamente para o teste a ser corrigido (% $NS_{Cliving}$).

31. As substâncias químicas de teste identificadas como produtoras, tanto da redução direta de MTT (ver parágrafo 29), quanto da interferência de cor (consulte o parágrafo 30), também exigirão um terceiro conjunto de controles, além dos controles NSMTT e NSC_{living}, descritos nos parágrafos anteriores: a medição de absorbância padrão (AP). Este é geralmente o caso de substâncias químicas de teste de cores escuras que interferem com o teste MTT (por exemplo, azul, roxo, preto), porque sua cor intrínseca impede a avaliação de sua capacidade de reduzir diretamente o MTT descrito em parágrafo 29. Essas substâncias químicas podem se ligar a tecidos vivos ou mortos e, portanto, o controle NSMTT pode não só corrigir a potencial redução direta de MTT pela substância química em teste, como também, a interferência de cor resultante da ligação da substância química aos tecidos mortos. Isso poderia levar a uma dupla correção de interferência de cor, uma vez que o controle NSC_{living} já corrige a interferência de cor, decorrente da ligação da substância química em teste aos tecidos vivos. Para evitar uma possível dupla correção para interferência de cores, um terceiro controle para cores não específi-

cas em tecidos mortos (NSC_{killed}) precisa ser realizado. Neste controle adicional, a substância química em teste é aplicada em, pelo menos, duas réplicas de tecidos mortos, que são submetidos a todo o procedimento de teste, mas são incubados com solução de meio, em vez de MTT, durante o passo de incubação de MTT. Um único controle NSC_{killed} é suficiente por produto químico, independentemente do número de testes/ execuções realizados em separado. Porém, o controle NSC_{killed} deve ser realizado simultaneamente ao controle NSMTT e, quando possível, com o mesmo lote de tecido. A verdadeira viabilidade tecidual é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidual obtida com tecidos vivos expostos à substância química de teste, menos a porcentagem de NSMTT e menos a porcentagem de NSC_{living}, mais a porcentagem de cor não específica obtida com tecidos mortos expostos à substância química interferente e incubados com meio sem MTT, calculado em relação ao controle negativo executado simultaneamente ao teste que está sendo corrigido (% NSC_{killed}).

32. É importante notar que a redução não específica do MTT e as interferências de cor não específicas podem aumentar as leituras do extrato de tecido acima da faixa de linearidade do espectrofotômetro. Nesta base, cada laboratório deve determinar o intervalo de linearidade do seu espectrofotômetro com MTT formazan (CAS # 57360-69-7) de uma fonte comercial, antes de iniciar o teste de substâncias químicas para fins regulatórios. A medição de absorbância padrão (AP), usando um espectrofotômetro é apropriada para avaliar redutores de MTT diretos e substâncias químicas de interferência de cor, quando as DOs dos extratos de tecido obtidos com a substância química teste sem qualquer correção para redução direta de MTT e/ou interferência de cor, estão dentro do faixa linear do espectrofotômetro ou quando a percentagem de viabilidade não corrigida obtida com a substância química em estudo já é $\leq$50%. No entanto, os resultados para substâncias químicas de teste que produzem %NSMTT e ou %NSC_{living} $\geq$50% do controle negativo, devem ser tomados com precaução, pois este é o limite utilizado para distinguir substâncias químicas classificadas de não classificadas (ver parágrafo 36).

Para substâncias químicas de teste coloridas que não são compatíveis com a medição de absorbância padrão (AP) devido à forte interferência com o ensaio MTT, o procedimento alternativo de espectrofotometria por HPLC/ UPLC para medir o MTT formazan pode ser empregado (ver parágrafo 34)[36]. O sistema de espectrometria por HPLC/ UPLC permite a separação do MTT formazan da substância química antes da sua quantificação[36]. Por esse motivo, os controles NSC_{living} ou NSC_{killed} nunca são necessários ao usar a espectrofotometria por HPLC/ UPLC, independentemen-

te da substância química a ser testada. Os controles NSMTT devem, no entanto, ser usados se houver suspeita de que a substância química em teste possa reduzir diretamente o MTT ou tenha uma cor que impeça a avaliação da capacidade de reduzir diretamente o MTT (conforme descrito no parágrafo 29). Quando se utiliza espectrofotometria por HPLC/ UPLC para medir o MTT formazan, calcula-se a percentagem de viabilidade tecidual como a percentagem da área do pico do MTT formazan obtida com tecidos vivos expostos à substância química, relativamente ao pico do MTT formazan obtido com o controle negativo concorrente. Para substâncias químicas de teste, capazes de reduzir diretamente o MTT, a viabilidade tecidual verdadeira é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidual obtida com tecidos vivos expostos à substância química de teste menos %NSMTT. Finalmente, deve-se notar que os redutores de MTT diretos que: i) podem interferir com a cor, ii) são retidos nos tecidos após o tratamento e iii) reduzem o MTT tão fortemente que levam a DOs (usando medição DO padrão) ou áreas de pico (usando espectrofotometria por UPLC/ HPLC) dos extratos de tecidos testados que não se enquadram na gama de linearidade do espectrofotômetro não podem ser avaliados, embora se espere que ocorram apenas em situações muito raras.

34. A espectrofotometria por HPLC/ UPLC também pode ser utilizada com todos os tipos de substâncias químicas de teste (redutoras coloridas, não coloridas, MTT e não-MTT) para a medição do MTT formazan[36]. Devido à diversidade de sistemas de espectrofotometria por HPLC/ UPLC, a qualificação do sistema de HPLC/ UPLC deve ser demonstrada antes de seu uso para quantificar MTT formazan, a partir de extratos de tecido atendendo aos critérios de aceitação para um conjunto de parâmetros de qualificação padrão, baseados naqueles descritos na orientação da Food and Drug Administration dos EUA para a indústria sobre validação de método bioanalítico[36-37]. Estes parâmetros-chave e seus critérios de aceitação são mostrados no anexo 4. Uma vez que os critérios de aceitação definidos no anexo 4 tenham sido satisfeitos, o sistema de espectrofotometria por HPLC/ UPLC é considerado qualificado e pronto para medir o MTT formazan, sob as condições experimentais descritas nesta diretriz.

Critérios de Aceitação

35. Para cada método de teste usando lotes válidos do modelo RhE (ver parágrafo 23), os tecidos tratados com o controle negativo devem exibir DO refletindo a qualidade dos tecidos que seguiram as etapas de embarque, recebimento e todos os processos do protocolo. Os valores de controle de DO não devem estar abaixo dos limites historicamente estabelecidos. Da mesma forma, os tecidos tra-

tados com o CP, ou seja, SDS aquosa a 5%, devem refletir a sua capacidade de responder a uma substância química irritante nas condições do método de teste (ver anexo 3 e para mais informações POPs dos quatro métodos de teste incluídos nesta diretriz)[32-35]). As medidas de variabilidade associadas e apropriadas entre as réplicas de tecido, isto é, os desvios padrão (DP), deverão estar dentro dos limites de aceitação estabelecidos para o método de teste utilizado (ver anexo 3).

Interpretação de Resultados e Modelo de Predição

36. Os valores de DO obtidos em cada substância química em teste podem ser usados para calcular a porcentagem de viabilidade normalizada para o controle negativo, que é definido como 100%. No caso de ser utilizada espectrofotometria por HPLC/ UPLC, a percentagem de viabilidade tecidual é calculada como a área do pico de MTT formazan em percentual obtida com tecidos vivos expostos à substância química em teste, em relação ao pico do MTT formazan obtido com o controle negativo concorrente. O valor de corte da viabilidade celular em percentual, que diferencia substâncias químicas irritantes e não-classificadas e o(s) procedimento(s) estatístico(s) usado(s) para avaliar os resultados e identificar substâncias químicas irritantes, deve ser claramente definido, documentado e comprovar ser apropriado (ver POPs dos métodos de teste para informação). Os valores de corte para a previsão de irritação são apresentados abaixo:

- A substância química em estudo é identificada como exigindo classificação e rotulagem de acordo com UN GHS (Categoria 2 ou Categoria 1) se a porcentagem média de viabilidade tecidual, após a exposição e incubação pós-tratamento, for menor ou igual (≤) a 50%. Como os métodos de teste de RhE, cobertos por esta diretriz, não diferenciam entre as Categorias 1 e 2 do GHS da ONU, mais informações sobre corrosão cutânea serão necessárias para decidir sua classificação final [ver também o Documento de Orientação da AITA[3]]. Caso a substância química em estudo seja considerada não-corrosiva (por exemplo, com base nas diretrizes 430, 431 ou 435) e a viabilidade do tecido após a exposição e a incubação pós-tratamento for menor ou igual (≤) a 50%, a substância química é considerada irritante cutâneo, de acordo com a categoria 2 do UN GHS.
- Dependendo do esquema regulatório dos países membros, a substância química em estudo pode ser considerada não irritante para a pele de acordo com UN GHS Sem Categoria se a viabilidade do tecido após exposição e incubação pós-tratamento for maior do que (>) 50%.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

37. Para cada ensaio, os dados de tecidos replicados individuais (por exemplo, valores DO e percentagem calculada de dados de viabilidade celular para cada substância química em estudo, incluindo sua classificação) devem ser relatados em forma de tabelas, incluindo dados de experiências repetidas, se apropriado. Além disso, as médias ± DP (desvio padrão) para cada execução devem ser relatadas. Interações observadas com o reagente MTT e substâncias químicas de teste coloridas devem ser relatados para cada substância química testada.

Relatório de teste

38. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

Substâncias químicas de Teste e Substâncias de Controle:

- Substância monoconstituinte: identificação química, como nome IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, se apropriado e factível, etc .;
- Substância multiconstituinte, UVCB e mistura: caracterizada tanto quanto possível por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes;
- Aparência física, solubilidade em água e quaisquer outras propriedades físico-químicas relevantes;
- Fonte, número do lote, se disponível;
- Tratamento da substância química/ substância de controle antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem);
- Estabilidade da substância química em estudo, data limite de uso ou data para reanálise, se conhecida;
- Condições de armazenamento.

Modelo e protocolo de RhE usado (e justificativa para a escolha, se aplicável)

Condições de teste:

- Modelo de RhE utilizado (incluindo o número do lote);

- Informação de calibração para o dispositivo de medição (por exemplo, espectrofotômetro), comprimento de onda e passagem de banda (se aplicável) usada para quantificar o MTT formazan e faixa de linearidade do dispositivo de medição;
- Descrição do método usado para quantificar o MTT formazan.

Descrição da qualificação do sistema de espectrofotometria por HPLC/ UPLC, se aplicável; Informações completas de suporte para o modelo RhE específico usado, incluindo seu desempenho. Isso deve incluir, mas não está limitado a;

  - Viabilidade;
  - Função de barreira;
  - Morfologia;
  - Reprodutibilidade e previsibilidade;
  - Controles de qualidade (CQ) do modelo.
- Referência aos dados históricos do modelo. Isso deve incluir, mas não se limita à aceitabilidade dos dados de CQ com referência aos dados de lote históricos.
- Demonstração de proficiência na realização do método de teste antes do uso rotineiro pelo teste das substâncias de proficiência.

Procedimento de Teste:

- Detalhes do procedimento de ensaio utilizado (incluindo os procedimentos de lavagem utilizados após o período de exposição); Dose das substâncias químicas em teste e das substâncias de controle utilizadas;
- Duração e temperatura de exposição e período de incubação pós-exposição;
- Indicação dos controles utilizados para os redutores diretos de MTT e/ou as substâncias químicas corantes, se aplicável;
- Número de réplicas de tecidos utilizados por substância química em teste e substância de controles (CP, controle negativo e NSMTT, NSC_{living} e NSC_{killed}, se aplicável);
- Descrição dos critérios de decisão/ modelo de predição aplicados com base no modelo de RhE utilizado;
- Descrição de quaisquer modificações no procedimento de teste (incluindo procedimentos de lavagem).

Os critérios de aceitação de teste e de execução:

- Valores médios de controle positivo e negativo e intervalos de aceitação baseados em dados históricos; variabilidade aceitável entre replicações de tecidos para controles positivos e negativos;
- Variabilidade aceitável entre replicações de tecido para a substância química em teste.

Resultados:

- Tabulação de dados da substância química em teste individual para cada ensaio e cada medição de réplica, incluindo a área do pico da DO ou do MTT formazan, porcentagem de viabilidade do tecido, porcentagem média de viabilidade do tecido e SD;
- Se aplicável, os resultados dos controles utilizados para os redutores diretos de MTT e/ou substâncias químicas corante, incluindo a área do pico da DO ou MTT formazan,% NSMTT,% NSC_{living},% NSC_{killed}, SD, percentagem final correta de viabilidade tecidual;
- Resultados obtidos com a(s) substância(s) química(s) de teste e substâncias de controle em relação aos critérios de aceitação definidos;
- Descrição de outros efeitos observados;
- A classificação derivada com referência ao modelo de previsão/ critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

LITERATURA

1) United Nations (UN). (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

2) EURL-ECVAM. (2009). Statement on the "Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the

Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

3) OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

4) OECD. (2015). OECD Guideline for Testing of Chemicals. (No. 404) : Acute Dermal Irritation, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

5) OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 430): *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER).

6) OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431): *In Vitro* Skin Model. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

7) OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 435); *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

8) OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

9) OECD. (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, Toxicol. *in Vitro* 15, 57-93.

11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, Toxicol. *in Vitro* 16, 765-770.

12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the

Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107-114.

13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, ATLA 35, 603-619.

19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, AATEX, 14, 351-358.

20) EURL-ECVAM. (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing].

21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] N.B. These are the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.

22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing].

23) OECD. (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No. 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, J Toxicol Sci, 34, 327-334

25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, AATEX, 16, 111-122

26) OECD. (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

27) OECD. (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, Altern Lab Anim, 40, 33-50.

29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, Toxicol. *In Vitro* 18, 231-243.

30) Eskes, C. et al. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion

and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.Toxicol.Pharmacol. 62, 393-403).

31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

32) EpiSkin™. (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].

33) EpiDerm™. (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200). Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].

34) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].

35) LabCyte. (June 2011). EPI-MODEL 24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL 24". Available at: http://www.jpte.co.jp/english/business/LabCyte/Testprotocol.pdf

36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

37) US FDA. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

39) EURL-ECVAM. (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] N.B. This

is the current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available related to the present TG.

40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing].

41) EC. (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

ANEXO 1

Definições

*Precisão***:** a proximidade da concordância entre os resultados do método e os valores de referência aceitos. É uma medida de desempenho do método e um aspecto de relevância. O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância" para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste [(9).]

Viabilidade celular: parâmetro que mede a atividade total de uma população celular, como a capacidade de desidrogenases mitocondriais para reduzir o corante vital MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazio, azul de tiazolilo), que, dependendo do término medido e do desenho de teste utilizado, correlaciona-se com o número total e/ou vitalidade das células vivas.

Substância química: significa uma substância ou mistura.

Concordância: esta é uma medida do desempenho do teste para métodos que fornecem um resultado categórico e é um aspecto de relevância. O termo é algumas vezes usado de forma intercambiável com precisão e é definido como a proporção de todas as substâncias químicas testadas que são classificadas corretamente como positivas ou negativas. A concordância é altamente dependente da prevalência de positivas nos tipos de substâncias químicas testadas[(9)].

ET_{50}: pode ser estimado pela determinação do tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50% após a aplicação da substância química de referência em uma concentração fixa e especificada. Consulte também IC_{50}.

GHS (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos pelas Nações Unidas (ONU)): um sistema que propõe a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas) de acordo com os tipos e níveis padronizados de riscos físicos, de saúde e ambientais, também abordando os elementos de comunicações correspondentes, tais como pictogramas, palavras-sinal, declarações de perigo, declarações de precaução e fichas de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o ambiente[1].

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

AITA: Abordagem Integrada em Teste e Avaliação.

IC_{50}: pode ser estimado pela determinação da concentração na qual uma substância química de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50% (IC_{50}) após um tempo de exposição fixo; ver também ET_{50}.

Dose infinita: quantidade de substância química de teste aplicado à epiderme, excedendo a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície da mesma.

Mistura: significa uma mistura ou uma solução composta por duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem.

Substância monoconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, na qual um constituinte principal está presente em pelo menos 80% (p/p).

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

Substância multiconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que mais de um constituinte principal está presente numa concentração $\geq$10% (p/p) e $<$80% (p/p). Uma substância multiconstituinte é o resultado de um

processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela mistura de duas ou mais substâncias sem reação química. Uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

NSC_{killed}: cor não específica em tecidos mortos.

NSC: cor não específica em tecidos vivos.

NSMTT: redução de MTT não específica.

Padrões de desempenho (PS): padrões baseados em um método de teste validado, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método de teste proposto que é mecânica e funcionalmente similar. Estão incluídos: (i) componentes essenciais do método de teste; (ii) uma lista mínima de Substâncias Químicas de Referência selecionados dentre as substâncias químicas utilizadas para demonstrar o desempenho aceitável do método de teste validado; e (iii) os níveis comparáveis de exatidão e confiabilidade, com base no que foi obtido para o método de teste validado. O método de teste deve, quando avaliado, demonstrar esses níveis, usando a lista mínima de Substâncias Químicas de Referência[9].

PC: Positive Control em inglês, Controle Positivo (CP) em português, é uma réplica contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo, ao longo do tempo, possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser demasiada.

Relevância: descrição da relação do teste com o efeito de interesse e se este é significativo e útil para uma finalidade específica. É a medida que o teste mede ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[9].

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado reprodutivelmente, dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, usando o mesmo protocolo. É avaliado pelo cálculo da reprodutibilidade intra e interlaboratorial[9].

Teste de substituição: um teste projetado para substituir outro, que está em uso rotineiro e aceito para identificação e/ou avaliação de riscos, e que foi designado para fornecer proteção equivalente ou melhorada para saúde humana, animal ou

do meio ambiente, sendo aplicável para todas as possíveis situações de teste e substâncias químicas, a exemplo do teste principal e rotineiro[9].

Execução: uma execução consiste em uma ou mais substâncias químicas em teste, realizados simultaneamente, com um controle negativo e um positivo.

Sensibilidade: a proporção de todas as substâncias químicas de teste positivas/ativas que são corretamente classificadas. É uma medida de precisão para um método de ensaio, que produz resultados categóricos de grande importância na avaliação de relevância [9].

Irritação cutânea in vivo: a produção de danos reversíveis na pele após a aplicação de uma substância química em teste por até 4 horas. A irritação cutânea é uma reação que surge no tecido cutâneo afetado e, aparece logo após a estimulação[38]. É causada por uma reação inflamatória local envolvendo o sistema imunológico inato (não específico) do tecido da pele. Sua principal característica é o seu processo reversível envolvendo reações inflamatórias e a maioria dos sinais clínicos característicos de irritação (eritema, edema, prurido e dor) relacionados a um processo inflamatório.

Especificidade: a proporção de todas as substâncias químicas de teste negativas/inativas que são corretamente classificadas. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos importantes na avaliação da relevância de um método de teste[9].

Substância: significa os elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou alteração da sua composição.

Substância química em teste: significa o que está sendo testado.

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra-Alto Eficiência.

UVCB: substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexas ou materiais biológicos.

ANEXO 2

Métodos de teste incluídos nesta diretriz

Nº.	Nome do método de teste	Tipo de estudo de validação	Referências
1	**EpiSkin™**	Estudo completo de validação prospectiva (2003-2007). Os componentes do método de ensaio deste método foram utilizados para definir os componentes essenciais do método de ensaio do ECVAM PS original e atualizado [39-40;21] *. Além disso, os dados do método relativos à identificação de substâncias não classificadas vs substâncias classificadas formaram a base principal para definir os valores de especificidade e sensibilidade do PS original *.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	**EpiDerm™ SIT (EPI-200)**	EpiDerm™ (original): Inicialmente, o método de teste foi submetido à validação prospectiva completa juntamente com o nº. 1 de 2003-2007. Os componentes do do teste deste método foram utilizados para definir os elementos essenciais dos métodos de ensaio do ECVAM PS original e atualizado [39-40;21] *.	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21)
		EpiDerm™ SIT (EPI-200): Uma modificação do EpiDerm™ original foi validada usando o ECVAM PS original [21] em 2008 *	(2) (21) (22) (23) (33)
3	**SkinEthic™ RhE**	Estudo de validação baseado nos Padrões de Desempenho ECVAM originais [21] em 2008 *.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	**LabCyte EPI-MODEL24 SIT**	Estudo de validação (2011-2012) baseado nos Padrões de Desempenho (PS) da OECD DT 439[8] baseados no ECVAM PS atualizado *[39] [40].	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) e PS desta TG (8)*

[*] Os Padrões de Desempenho ECVAM (PS) originais[21] foram desenvolvidos em 2007, após a conclusão do estudo de validação prospectiva[16]; esta avaliação considerou o desempenho dos métodos de teste No. 1 e 2 em relação ao sistema de classificação descrito na 28ª alteração na Diretiva para as Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia[41]. Em 2008, o GHS da ONU foi introduzido[1] efetivamente, mudando o valor de corte de 2,0 a 2,3 *in vivo* para distinguir substâncias não classificadas das substâncias classificadas. Para se adaptar a esta alteração na exigência regulamentar, os valores de precisão e a lista de substâncias químicas de referência do ECVAM PS foram atualizados em 2009[2;39-40]. Como o PS original, também o PS atualizado foi amplamente baseado em dados dos métodos No. 1 e 2[16], mas adicionalmente, utilizou dados sobre substâncias químicas de referência do método No. 3. Em 2010, o ECVAM PS atualizado foi usado para estipular o PS relacionado

a esta diretriz[8]. Para os fins desta diretriz, o EpiSkin™ é considerado o VRM, por ter sido usado para desenvolver todos os critérios do PS. Informações detalhadas sobre os estudos de validação, uma compilação dos dados gerados, bem como o contexto/ pano de fundo para as adaptações necessárias do PS, como consequência da implementação do GHS da ONU, podem ser encontradas no documento explicativo do ECVAM/ BFR referente a esta diretriz da OECD[23].

SIT: Teste de Irritação Cutânea.

RhE: Epiderme Humana Reconstruída.

ANEXO 3

Parâmetros de protocolo específicos a cada um dos métodos de ensaio incluídos nesta diretriz

Os métodos RhE mostram protocolos muito semelhantes e, notavelmente, todos usam um período pós-incubação de 42 horas[32-35]. As variações dizem respeito principalmente a três parâmetros relacionados com as diferentes funções de barreira dos métodos de teste e listados aqui: A) Tempo e volume de pré-incubação, B) Aplicação de substâncias químicas de teste e C) Volume pós-incubação.

	EpiSkinTM (SM)	**EpiDerm™ SIT (EPI-200)**	**SkinEthic RhE™**	**LabCyte EPI-MODEL24 SIT**
A) Pre-incubação				
Tempo de incubação	18 a 24 horas	18 a 24 horas	≥ 2 horas	15 a 30 horas
Volume do meio	2mL	0.9 mL	0.3 ou 1 mL	0.5 mL
B) Aplicação do produto químico de teste				
Para líquidos	10μL (26μL/cm^2)	30μL (47μL/cm^2)	16μL (32μL/cm^2)	25μL (83μL/cm^2)
Para sólidos	10mg (26mg/cm^2) + DW (5μL)	25mg (39mg/cm^2) + DPBS (25μL)	16mg (32mg/cm^2) + DW (10μL)	25mg (83mg/cm^2) + DW (25μL)
Uso de malha de nylon	Não se usa	Se necessário	Aplicável	Não se usa
Tempo total de aplicação	15 minutos	60 minutos	42 minutos	15 minutos
Temperatura das aplicações	Temperatura Ambiente (TA)	a) em TA por 25 minutos; b) a 37°C por 35 minutos	TA	TA

	EpiSkinTM (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RhE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
C) Volume pós-incubação				
Volume do meio	2 mL	0.9mL x 2	2 mL	1 mL
D) Variabilidade máxima aceitável				
Desvio padrão entre réplicas de tecido	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18

DW: água destilada.

DPBS: Soro fisiológico de fosfato de Dulbecco.

ANEXO 4

Parâmetros-chave e critérios de aceitação para qualificação de um sistema de espectrofotometria por HPLC/ UPLC para medição de MTT formazan extraído de tecidos de RHE

Parâmetro	Protocolo Derivado do Guia da FDA[36-37]	Critério de aceitação
Seletividade	Análise de isopropanol, resíduo vivo (extrato de isopropanol a partir de tecidos de RhE vivos sem qualquer tratamento), vazio morto (extrato de isopropanol de tecidos RhE mortos sem qualquer tratamento)	Área de interferência ≤ 20% of $Area_{LLOQ1}$
Precisão	Controles de Qualidade (ou seja, MTT formazan a 1,6 μg/mL, 16 μg/mL e 160 μg/mL) em isopropanol (n = 5)	CV ≤ 15% ou ≤ 20% para o LLOQ
Acuracidade	Controle de Qualidade em isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15% ou ≤ 20% para o LLOQ
Efeito de Matriz	Controle de Qualidade em vazio vivo (n=5)	85% ≤ Efeito de Matriz % ≤ 115%
Transferência	Análise de isopropanol após um $ULOQ^2$ padrão	Area de interferência ≤ 20% da $Área_{LLOQ}$

Parâmetro	Protocolo Derivado do Guia da FDA[36-37]	Critério de aceitação
Reprodutibilidade (intra-dia)	3 curvas de calibração independentes (com base em 6 diluições de 1/3 consecutivas de MTT formazan em isopropanol começando em ULOQ, isto é, 200 μg / mL); Controles de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curvas de calibração: %Dev ≤ 15% ou ≤ 20% para o LLOQ; Controles de Qualidade: %Dev ≤ 15% e CV ≤ 15%
Reprodutibilidade (inter-dia)	Dia 1: 1 curva de calibração e controles de qualidade em isopropanol (n = 3); Dia 2: 1 curva de calibração e controles de qualidade em isopropanol (n = 3); Dia 3: 1 curva de calibração e controles de qualidade em isopropanol (n = 3).	
Estabilidade de curto prazo do do MTT formazan no extrato de tecido de RhE	Controles de Qualidade em vazio vivo (n = 3) analisados no dia da preparação e após 24 horas de armazenamento à temperatura ambiente	%Dev ≤ 15%
Estabilidade de longo prazo do do MTT formazan no extrato de tecido de RhE	Os controles de qualidade em vazio vivo (n = 3) analisam o dia da preparação e depois de vários dias de armazenamento a uma temperatura especificada (por exemplo, 4ºC, -20ºC, -80ºC)	%Dev ≤ 15%

[1] LLOQ: Limite Inferior de Quantificação, definido para cobrir 1-2% de viabilidade tecidual, ou seja, 0,8μg/ mL.

[2] ULOQ: Limite Superior de Quantificação, definido como sendo pelo menos duas vezes superior à concentração de MTT formazan mais elevada esperada em extratos de isopropanol a partir de controles negativos, isto é, 200μg/ mL.

Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 429

Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local

INTRODUÇÃO

1. As diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas são periodicamente revisadas devido ao progresso científico, à mudança de necessidades regulatórias e às considerações de bem-estar animal. A diretriz original (abreviação TG, do inglês "Test Guideline") para a determinação da sensibilização cutânea do rato, o Ensaio do Gânglio Linfático Local (LLNA, Diretriz 429) foi adotada em 2002[1]. Os detalhes da validação do LLNA e uma revisão do trabalho associado foram publicados nas referências listadas em LITERATURA (ver adiante), nos itens 2 a 11. O LLNA atualizado é baseado na avaliação de dados científicos e experimentais[12]. Esse é o segundo TG realizado para avaliar o potencial de sensibilização cutânea de substâncias químicas em animais. O outro TG (ou seja, o TG 406) utiliza cobaias para testes, notavelmente o teste de maximização de cobaias e o teste de Buehler[13]. O LLNA tem vantagens sobre o TG 406[13] com relação ao bem-estar animal. Esse GT LLNA atualizado inclui o conjunto de Padrões de Desempenho (anexo 1) que podem ser usados para avaliar o status da validação dos métodos de testes novos e/ou modificados, que são funcional e mecanicamente similares ao LLNA, de acordo com os princípios do Documento de Orientação número 34[14].

2. O LLNA estuda a fase de indução da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação de dose-resposta. Os sensibilizadores suaves/moderados são recomendados como substâncias de teste adequadas para controle positivo (CP) nos métodos de teste de cobaia (ou seja, TG 406)[13] . Estes sensibilizadores também são adequados para utilização com o LLNA[6,8,15]. Uma abordagem reduzida de LLNA (que será chamada de rLLNA), que poderia usar até 40% menos animais, também é descrita como uma opção nesse TG[16-18]. O rLLNA pode ser usado quando há necessidade regulatória de confirmar uma previsão negativa do potencial de sensibilização cutânea, desde que haja aderência a todas as outras especificações do protocolo LLNA, conforme descrito nesta diretriz de teste (TG). A previsão de um resultado negativo deve ser feita com base em todas as informações disponíveis, conforme descrito no parágrafo

4. Antes de aplicar a abordagem rLLNA, devem ser fornecidas justificativas científicas claras para seu uso. Se, contrariando as expectativas, um resultado positivo ou equivocado for obtido no rLLNA, testes adicionais podem ser necessários para interpretar ou esclarecer este resultado. O rLLNA não deve ser usado para a identificação de risco de substâncias de teste de sensibilização cutânea quando se precisa de informação de dose-resposta, tal como a subcategorização para o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU.

DEFINIÇÕES

3. Definições usadas são fornecidas no anexo 2.

LIMITAÇÕES E CONSIDERAÇÕES INICIAIS

4. O LLNA fornece um método alternativo para identificar potenciais substâncias de teste de sensibilização cutânea. Isto não implica necessariamente que, em todos os casos, o LLNA deva ser usado no lugar de testes em cobaias (isto é, TG 406)[13], mas sim que o ensaio é de mérito igual e pode ser empregado como uma alternativa, na qual resultados positivos e negativos, de modo geral, não exigem mais confirmação. Os testes laboratoriais devem considerar todas as informações disponíveis sobre a substância em teste antes de conduzir o estudo. Tais informações incluirão a identidade e a estrutura química da substância em teste; suas propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância em teste; e dados toxicológicos sobre a estrutura relacionada das substâncias em teste. Esta informação deve ser considerada para determinar se o LLNA é apropriado para a substância em teste (dada à incompatibilidade de tipos limitados de substâncias em teste com o LLNA - ver parágrafo 5) e para auxiliar na seleção da dose.

5. O LLNA é um método *in vivo* e, consequentemente, não elimina o uso de animais na avaliação da atividade de sensibilização alérgica por contato. Tem, no entanto, o potencial para reduzir o número de animais necessários para este fim. Além disso, o LLNA oferece um refinamento substancial (menos dor e angústia) da maneira como os animais são usados para testes de sensibilização alérgica por contato. O LLNA baseia-se na consideração de eventos imunológicos estimulados por substâncias químicas durante a fase de indução da sensibilização.

Ao contrário dos testes com cobaias (TG 406)[13], o LLNA não requer que sejam eliciadas reações de hipersensibilidade dérmica induzida por desafio. Inclusive, o LLNA não requer o uso de um adjuvante, como é o caso do teste de maximização de cobaias[13]. Assim, o LLNA reduz a dor e a angústia dos animais. Apesar das vantagens do LLNA sobre o TG 406, deve-se reconhecer que existem algumas limitações que podem exigir o uso do TG 406(13) (por exemplo, resultados falso-negativos no LLNA com metais específicos, resultados falso-positivos com certos irritantes da pele [como alguns produtos químicos do tipo surfactante][19,20], ou solubilidade da substância de teste). Ademais, as classes de substâncias em teste ou substâncias contendo grupos funcionais que demonstraram atuar como fatores de desordem em potencial[21] podem exigir o uso de testes em cobaia (ou seja, TG 406)[13]. Com isso e, de acordo com a base de dados limitada de validação, que consistia principalmente em formulações de pesticidas, o LLNA tem maior probabilidade de produzir resultado positivo para estes tipos de substâncias de teste do que o teste em cobaia[22]. No entanto, ao testar formulações, pode-se considerar a inclusão de substâncias em teste similares com resultados conhecidos, como substâncias teste de referência, para demonstrar que o LLNA está funcionando adequadamente (ver parágrafo 16). Para outras limitações, além das identificadas, o LLNA deve ser aplicável para avaliar quaisquer substâncias teste, a menos que existam propriedades associadas a estas substâncias teste que possam interferir com a precisão do LLNA.

PRINCÍPIO DO TESTE

6. O princípio básico subjacente ao LLNA é que os sensibilizadores induzem a proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos que drenam o local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dose e à potência do alérgeno aplicado e proporciona um meio simples de obter uma medição quantitativa da sensibilização. Este aumento é medido comparando-se a proliferação média em cada grupo de teste com a proliferação média no grupo de controle tratado com veículo (VC). A razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e no grupo VC concomitante, denominado Índice de Estimulação (IE), é determinada e deve ser ≥ 3 antes que a classificação da substância em teste como um potencial sensibilizador seja estabelecida. Os métodos descritos aqui são baseados no uso de marcação radioativa in vivo para medir um número aumentado de células proliferativas nos gânglios linfáticos auriculares de drenagem. No entanto, podem ser utilizados outros parâmetros para a avaliação do número de

células em proliferação, desde que os requisitos dos Padrões de Performance sejam cumpridos na íntegra (anexo 1).

DESCRIÇÃO DO ENSAIO

Seleção da espécie animal

7. O camundongo é a espécie de escolha para este teste. Utilizam-se camundongos fêmeas, adultas, jovens e da raça CBA/Ca ou CBA/J que sejam nulíparas e não prenhas. No início do estudo, os animais devem ter entre 8 e 12 semanas de idade e a variação de peso dos animais deve ser mínima e não exceder 20% do peso médio. Alternativamente, outras raças e machos podem ser utilizados quando forem produzidos dados suficientes para demonstrar que não existem diferenças significativas de raça e/ou gênero na resposta do LLNA.

Condições de acomodação e alimentação

8. Os camundongos devem ser alojados em grupo[23], a menos que seja fornecida uma justificativa científica adequada para o alojamento de camundongos individualmente. A temperatura da sala experimental do animal deve ser 22 ± 3°C. Embora a umidade relativa deva ser de, pelo menos, 30% e preferivelmente não exceder 70%, a não ser durante a limpeza do ambiente, a umidade ideal deve ser de 50 a 60%. A iluminação deve ser artificial, sendo a sequência de 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Para alimentação, as dietas convencionais de laboratório podem ser usadas, com suprimento ilimitado de água potável.

Preparação de animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados para permitir a identificação individual (mas não por qualquer forma de marcação auricular) e mantidos em suas caixas por, pelo menos, cinco dias antes do início da dosagem, para permitir a aclimatação às condições laboratoriais. Antes do início do tratamento, todos os animais são examinados para garantir que não tenham lesões cutâneas observáveis.

Preparação da solução das doses

10. Substâncias sólidas de teste devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes/veículos e diluídas, se apropriado, antes da aplicação em uma orelha do camundongo. As substâncias em teste líquidas podem ser aplicadas puras ou diluídas antes da dosagem. Substâncias insolúveis, como aquelas geralmente

vistas em dispositivos médicos, devem ser submetidas à extração exaustiva em solvente apropriado para revelar todos os constituintes extraíveis para teste antes da aplicação na orelha do camundongo. As substâncias de teste devem ser preparadas diariamente, a menos que os dados de estabilidade demonstrem a aceitabilidade do armazenamento.

Verificação de confiabilidade

11. São usados controles positivos (CP) para demonstrar o desempenho apropriado do ensaio pela resposta de uma sensibilidade adequada e replicável a uma substância de teste, para a qual a magnitude da resposta é bem caracterizada. Recomenda-se a inclusão de um CP simultâneo, pois demonstra a competência do laboratório para realizar com sucesso cada ensaio e permite uma avaliação da replicabilidade e da comparabilidade – intra e inter – laboratório(s). Um CP para cada estudo também pode ser exigido por algumas autoridades reguladoras e, portanto, os usuários são encorajados a consultar as autoridades relevantes antes de conduzir o LLNA. Desta forma, o uso rotineiro de um CP concorrente é incentivado para evitar a necessidade de testes adicionais em animais para atender a tais requisitos que possam surgir do uso de um CP periódico (ver parágrafo 12). O CP deve produzir uma resposta positiva de LLNA a um nível de exposição esperado para dar um aumento no Índice de Estimulação (IE)>3 em relação ao grupo de controle negativo (CN). A dose de CP deve ser escolhida de modo a não causar irritação excessiva da pele ou toxicidade sistêmica e a indução deve ser reproduzível, mas não excessiva (ou seja, IE>20). As substâncias de ensaio preferidas para CP são o hexilcinamaldeído a 25% ("Chemical Abstracts Service [CAS]"nº101-86-0) em acetona: azeite (4:1, p/v) e 5% de mercaptobenzothiazole (número CAS 149-30-4).) em N,N-dimetilformamida (ver anexo 1, tabela 1). Pode haver circunstâncias em que outras substâncias de teste de CP podem ser usadas, atendendo aos critérios acima, com justificativa adequada.

12. Embora seja recomendada a inclusão de um grupo de CP simultâneo, podem existir situações em que a análise periódica (com intervalos ≤6 meses) da substância em teste de CP possa ser adequada para laboratórios que conduzam o LLNA regularmente (ou seja, conduzir o LLNA a uma frequência de não menos do que uma vez por mês) e tenham uma base de dados histórica estabelecida de CP que demonstre a capacidade do laboratório em obter resultados reproduzíveis e precisos com CP. A proficiência adequada com o LLNA pode ser demonstrada com sucesso pela geração de resultados positivos e consistentes com o CP em,

pelo menos, 10 testes independentes realizados dentro de um período razoável (isto é, menos de um ano).

13. Um grupo de CP concorrente deve sempre ser incluído quando houver mudança de procedimento no LLNA (por exemplo, mudança no pessoal treinado, nos materiais do método de teste e/ou reagentes, no equipamento do método de teste, na origem dos animais de teste) e as mudanças devem ser documentadas em relatórios de laboratório. Deve-se considerar o impacto dessas mudanças na adequação do histórico do banco de dados previamente determinados, para estimular a necessidade de estabelecer um novo histórico de banco de dados para documentar a consistência nos resultados do CP (Controle Positivo).

14. Os pesquisadores devem estar cientes de que a decisão de conduzir um estudo de CP periodicamente, em vez de simultaneamente, tem ramificações sobre a adequação e a aceitabilidade dos resultados negativos do estudo, gerados sem um CP concorrente durante o intervalo entre cada estudo periódico de CP. Por exemplo: se um resultado falso-negativo for alcançado no estudo periódico em CP, os resultados negativos da substância de teste obtidos no intervalo entre o último estudo periódico de CP aceitável e o inaceitável podem ser questionados. Implicações desses resultados devem ser cuidadosamente consideradas ao determinar se devem incluir CP simultâneos ou apenas conduzir CP periódicos. Deve-se considerar, também, o uso de menos animais no grupo CP concomitante, quando isso for cientificamente justificado e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos específicos, que menos camundongos possam ser usados[12].

15. Embora a substância em teste de CP deva ser testada no veículo que é conhecido por provocar uma resposta consistente (por exemplo, acetona: azeite; 4:1, p/v), pode haver certas situações regulatórias nas quais testar em um veículo não padronizado (formulação clinicamente/quimicamente relevante) também seja necessário[24]. Se a substância em teste do CP simultâneo for testada num veículo diferente da substância em teste, deve ser incluído um grupo de controle tratado com veículo (VC) separado para o CP concorrente.

16. Nos casos em que substâncias em teste de uma classe química específica ou faixa de respostas estão sendo avaliadas, as substâncias de referência em teste também podem ser úteis para demonstrar que o método está funcionando adequadamente na detecção do potencial de sensibilização cutânea desses tipos de

substâncias. As substâncias de referência em testes apropriados devem ter as seguintes propriedades:

- Semelhança estrutural e funcional à classe da substância a ser testada
- Características físico-químicas conhecidas
- Dados de suportes do LLNA
- Dados de suportes de outros modelos animais e/ou de humanos

PROCEDIMENTO DE TESTE

Número de animais e níveis de dose

17. Utiliza-se o mínimo de 4 animais por grupo de dose, com o mínimo de três concentrações da substância teste, mais um grupo de controle negativo (CN) simultâneo, tratado apenas com o veículo para a substância teste, e um CP (simultâneo ou recente, baseado nas políticas do laboratório, considerando os parágrafos 11-15). O teste de doses múltiplas do CP deve ser considerado, especialmente ao testar o CP de forma intermitente. Exceto pela ausência de tratamento com a substância em teste, os animais dos grupos de controle devem ser manuseados e tratados de maneira idêntica à dos animais nos grupos de tratamento.

18. A seleção de dose e veículo deve basear-se nas recomendações dadas nas referências[3,5]. As doses consecutivas são normalmente selecionadas de uma série de concentrações apropriadas, como 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, etc. Justificativa científica adequada deve acompanhar a seleção das séries de concentração usadas. Todas as informações toxicológicas existentes (toxicidade aguda e irritação dérmica), estruturais e físico-químicas sobre a substância de teste de interesse (e/ou substâncias de teste estruturalmente relacionadas) devem ser consideradas quando disponíveis, selecionando as três concentrações consecutivas, para que a concentração mais alta maximize a exposição, evitando toxicidade sistêmica e/ou irritação excessiva da pele local [3,25]. Na ausência de tal informação, pode ser necessário um teste inicial pré-triagem (ver parágrafos 21-24).

19. O veículo não deve interferir ou influenciar o resultado do ensaio e deve ser selecionado com base na maximização da solubilidade, a fim de obter a concentração mais elevada possível, produzindo, simultaneamente uma solução/

suspensão adequada para a aplicação da substância teste. Veículos recomendados são acetona: azeite (4:1, p/v), N,N-dimetilformamida, butanona (methylethylketone), propilenoglicol e dimetilsulfóxido[19], mas outros podem ser usados se razões científicas suficientes forem fornecidas. Em certas situações, poderá ser necessário utilizar um solvente clinicamente relevante ou a formulação na qual a substância de teste é comercializada como um controle adicional. Deve ter-se particular cuidado para assegurar que as substâncias hidrofílicas são incorporadas num sistema de veículo, o qual molha a pele e não escorre imediatamente, por incorporação de solubilizantes apropriados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1%). Assim, veículos totalmente aquosos devem ser evitados.

20. O processamento de gânglios linfáticos de camundongos individuais permite a avaliação da variabilidade interanimal e a comparação estatística da diferença entre a substância em teste e as medições do grupo VC (ver parágrafo 35). Contudo, avaliar a possibilidade de reduzir o número de camundongos no grupo CP é factível quando dados individuais de animais são coletados[12]. Algumas autoridades regulatórias nacionais exigem a coleta de dados individuais sobre animais. No entanto, dados de animais em grupo podem ser considerados aceitáveis por algumas autoridades reguladoras e, em tais situações, os usuários podem ter a opção de coletar dados dos animais individuais ou em grupo.

Teste de pré-triagem

21. Na ausência de informação para determinar a dose mais elevada a ser testada (ver parágrafo 18), deve ser realizado um teste de pré-triagem para definir o nível de dose apropriado a testar no LLNA. O objetivo do teste de pré-triagem é fornecer orientações para a seleção do nível máximo de dose a ser utilizada no estudo LLNA principal quando a informação sobre a concentração que induz toxicidade sistêmica (ver parágrafo 24) e/ou excessiva irritação local da pele (ver parágrafo 23) não estiver disponível. O nível máximo de dose testado deve ser de 100% da substância teste, para líquidos, ou a concentração máxima possível, para sólidos ou suspensões.

22. O teste pré-triagem é realizado em condições idênticas às do estudo LLNA principal, exceto que não há avaliação da proliferação de gânglios linfáticos e se pode utilizar menos animais por grupo de dose. Um ou dois animais por grupo de dose são sugeridos. Todos os camundongos serão observados diariamente

para quaisquer sinais clínicos de toxicidade sistêmica ou irritação no local da aplicação. Os pesos corporais são registrados antes do teste e antes do término (dia 6). Ambas as orelhas de cada camundongo são observadas, para eritema, e pontuadas usando a tabela 1[25]. As medições da espessura da orelha são feitas usando-se um medidor de espessura (por exemplo, micrômetro digital ou medidor de espessura Peacock Dial) no Dia 1 (pré-dose), no Dia 3 (aproximadamente 48 horas após a primeira dose) e no Dia 6. Com isso, no Dia 6, a espessura da orelha pode ser estabelecida por determinações do peso das orelhas após extração, que devem ser realizadas após os animais serem eutanasiados. A irritação cutânea local excessiva é indicada por escore de eritema ≥3 e/ou por aumento na espessura da orelha de ≥25% em qualquer dia de medição[26,27]. A dose mais elevada selecionada para o estudo principal de LLNA será a próxima dose mais baixa na série de concentrações pré-triagem (ver parágrafo 18) que não induza toxicidade sistêmica e/ou excessiva irritação local da pele.

Tabela 1: Pontos de eritema

Observação	**Ponto**
Sem eritema	0
Eritema bem fraco (quase imperceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema severo (vermelho próximo ao roxo/vermelho beterraba) à formação de cicatriz impossibilitando a classificação do eritema	4

23. Além do aumento de 25% na espessura da orelha[26,27], o acréscimo estatisticamente significativo na espessura da orelha nos camundongos tratados, em comparação com camundongos controle, também foi usado para identificar irritações nos animais no LLNA[28-34]. No entanto, enquanto aumentos estatisticamente significativos podem ocorrer quando a espessura da orelha for inferior a 25%, estes não foram associados especificamente à irritação excessiva[30,32-34].

24. As seguintes observações clínicas podem indicar toxicidade sistêmica[35,36], quando usadas como parte de uma avaliação integrada e, portanto, podem indicar o nível máximo de dose a ser usado no LLNA principal: alterações na função do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões);

diferenças no comportamento (agressividade, atividade de limpeza, mudança marcada no nível de atividade); alternações nos padrões respiratórios (ou seja, na frequência e na intensidade da respiração, tais como dispneia, respiração ofegante e estertores) e mudanças no consumo de alimentos e água. Além disso, sinais de letargia e/ou falta de responsividade e quaisquer sinais clínicos de dor ou angústia mais do que leve ou momentânea, ou redução >5% no peso corporal do Dia 1 ao Dia 6 e mortalidade devem ser considerados na avaliação. Animais moribundos ou animais evidenciando dor ou mostrando sinais de sofrimento severo e duradouro devem ser eutanasiados[37].

Agenda experimental do estudo principal

25. Segue a agenda experimental do ensaio:

- Dia 1

  Identificar e registrar individualmente o peso de cada animal e qualquer observação clínica. Aplicar 25µl da diluição apropriada da substância teste, o veículo isolado ou o CP (simultâneo ou recente, baseado na política de laboratório, em consideração aos parágrafos 11-15), no dorso de cada orelha.

- Dias 2 e 3

  Repetir o procedimento de aplicação começado no dia 1.

- Dias 4 e 5

  Sem tratamento.

- Dia 6

  Registrar o peso de cada animal. Injete 250µL de solução de tampão fosfato-salina esterilizada (PBS) contendo 20µCi (7,4x105Bq) de 3H-metil-timidina em todos os camundongos de controle e de teste pela veia da cauda. Alternativamente, injetar 250µL de PBS esterilizado contendo 2µCi (6,4x104Bq) de 125I-Iododeoxiuridina e 10-5M Floxuridina (fluorodeoxyuridine) em todos os camundongos pela veia da cauda. Cinco horas depois, eutanasiar os animais. Extrair os gânglios linfáticos auriculares de drenagem de cada orelha do camundongo e processar, em conjunto, em PBS para cada animal (abordagem animal individual); alternativamente, extrair e agrupe os gânglios linfáticos de cada orelha em PBS para cada grupo de tratamento (abordagem do grupo de tratamento agrupado). Detalhes e diagramas da identificação e da dissecação dos gânglios linfáticos podem ser encontrados em referência[12]. Para monitorar

ainda mais a resposta local da pele no estudo principal, parâmetros adicionais podem ser incluídos no protocolo do estudo, como pontuação de eritema da orelha ou medidas da espessura da orelha (obtidas por meio de um medidor de espessura ou pela determinação do peso da punção auricular na necropsia).

Preparação da suspensão de célula

26. Uma suspensão unicelular de células do gânglio linfático (LNC, do termo em inglês Lymph Node Cells) removida bilateralmente, usando-se a abordagem animal individual ou, alternativamente, a abordagem do grupo de tratamento combinado, é preparada por desagregação mecânica suave, através de gaze de aço inoxidável de 200 mícrons ou outra técnica aceitável para gerar uma única suspensão celular. As LNC são lavadas duas vezes com excesso de PBS e o DNA é precipitado com ácido tricloroacético a 5% (TCA) a 4°C por 18h[3]. Os sedimentos são suspensos novamente em 1mL de TCA e transferidos para frascos de cintilação contendo 10mL de fluido de cintilação para contagem 3H, ou transferidos diretamente para tubos de contagem gama para contagem de 125I.

Determinação da proliferação celular (radioatividade incorporada)

27. A incorporação de 3H-metil-timidina é medida por contagem de cintilação-β como desintegrações por minuto (DPM). A incorporação de 125I-iododesoxiuridina é medida por contagem de 125I e também é expressa como DPM. Dependendo da abordagem utilizada, a incorporação é expressa como DPM/camundongo (abordagem animal individual) ou DPM/grupo de tratamento (abordagem do grupo de tratamento em conjunto).

LLNA reduzido (rLLNA)

28. Em certas situações, quando há necessidade regulatória de confirmar uma predição negativa do potencial de sensibilização cutânea, pode ser aplicado um protocolo oCPional de rLLNA(16-18) usando menos animais, desde que haja aderência a todas as outras especificações do protocolo LLNA neste TG. Antes de aplicar a abordagem rLLNA, devem ser fornecidas justificativas claras e científicas para seu uso. Se um resultado positivo ou equivocado for obtido, ensaios adicionais podem ser necessários para interpretar ou esclarecer a descoberta.

29. A redução no número de grupos de dose é a única diferença entre os protocolos do método de teste LLNA e do rLLNA e, por esta razão, o rLLNA não fornece

informação sobre dose-resposta. Portanto, o rLLNA não deve ser usado quando informações de dose-resposta forem necessárias. Tal como o LLNA multidose, a concentração da substância de ensaio avaliada no rLLNA deve ser a concentração máxima que não induza toxicidade sistêmica manifesta e/ou excessiva irritação local da pele do camundongo (ver parágrafo 18).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

30. Cada camundongo deve ser cuidadosamente observado, pelo menos uma vez por dia, para analisar quaisquer sinais clínicos, quer seja irritação no local da aplicação, quer seja toxicidade sistêmica. Todas as ressalvas são sistematicamente anotadas, com registros mantidos para cada camundongo. Os planos de monitoramento devem incluir critérios para identificar prontamente aqueles camundongos para a eutanásia, ou seja, aqueles que exibem toxicidade sistêmica, irritação excessiva da pele local ou corrosão da pele[37].

Peso corporal

31. Como indicado no parágrafo 25, os pesos individuais dos animais devem ser medidos no início do teste e na eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

32. Os resultados para cada grupo de tratamento são expressos como o Índice de Estimulação (IE). Ao usar a abordagem animal individual, o IE é derivado da divisão do DPM médio/camundongo, dentro de cada grupo da substância teste, e o grupo de CP pelo DPM médio/camundongo para o solvente/grupo VC. O IE médio para os grupos VC é então igual a um. Ao usar a abordagem do grupo de tratamento agrupado, o IE é obtido pela divisão da incorporação radioativa agrupada para cada grupo de tratamento pela incorporação do grupo VC agrupado; isso produz o IE médio.

33. O processo de decisão considera um resultado positivo quando IE$\geq$3. Contudo, a potência da dose-resposta, a significância estatística e a consistência das respostas solvente/veículo e CP também podem ser usadas para determinar se um resultado limítrofe é declarado positivo[4-6].

34. Se for necessário esclarecer os resultados obtidos, deve ser dada atenção às várias propriedades da substância em estudo, incluindo se esta tem relação estrutural com os sensibilizantes cutâneos conhecidos, se causa excessiva irritação local na pele do camundongo e a natureza da relação dose-resposta observada. Essas e outras considerações são discutidas em detalhes em outra diretriz [7].

35. A coleta de dados de radioatividade, no ensaio para camundongo individual, possibilitará a análise estatística dos dados da presença e do grau de relação dose-resposta. Qualquer avaliação estatística pode incluir uma investigação da relação dose-resposta, bem como comparações adequadamente ajustadas de grupos de teste (por exemplo, grupo dosado por pares *versus* comparações simultâneas de VC). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, a regressão linear ou o teste de William, para explorar as tendências de dose-resposta, e o teste de Dunnett, para comparações de pares. Ao escolher um método apropriado de análise estatística, o investigador deve ter em mente possíveis desigualdades de variâncias e outros problemas relacionados que podem exigir uma transformação de dados ou uma análise estatística não paramétrica. Em qualquer caso, o investigador pode precisar realizar cálculos de IE e análises estatísticas com e sem certos pontos de dados (às vezes chamados de outliers ou aberrações estatísticas).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

36. Os dados devem ser resumidos em forma de tabela. Quando se utiliza a abordagem animal individual, devem-se mostrar os valores de DPM em animais individuais, DPM/animal médio por grupo, o erro associado (por exemplo, SD, SEM) e o IE médio para cada grupo de dose comparado ao grupo VC simultâneo. Ao usar a abordagem do grupo de tratamento combinado, mostram-se a média/mediana da DPM e a média da IE para cada grupo de dose comparada com o grupo simultâneo de CV.

Relatório de teste

37. O relatório de teste deve conter as seguintes informações:

Substância teste e substância controle do teste:

- Dados de identificação (por exemplo, número CAS, se disponível; fonte; pureza; impurezas conhecidas; número de lote)
- Natureza física e propriedades físico-químicas (como volatilidade, estabilidade, solubilidade)
- Se formulação, composição e porcentagem relativa de componentes Solvente/veículo:
- Dados de identificação (pureza; concentração, quando apropriado; volume usado)
- Justificativa para a escolha do veículo

Animais de teste:

- Origem do camundongo CBA
- Estado microbiológico dos animais, quando conhecido
- Número e idade dos animais
- Origem dos animais, condições de acomodação, dieta, etc.

Condições do teste:

- Detalhes da preparação e da aplicação da substância de teste
- Justificativa da seleção da dose (incluindo resultadas do teste pré-triagem, se conduzido)
- Concentração do veículo e da substância teste usados e quantidade total da substância teste aplicada
- Detalhes da qualidade de água e comida (tipo/origem de dieta, fonte de água)
- Detalhes das agendas de tratamento e amostragem
- Métodos para medição de toxicidade
- Critérios para considerar o estudo positivo ou negativo
- Detalhes de qualquer desvio de protocolo e uma explicação em como o desvio afeta o estudo e seus resultados

Verificação de confiabilidade:

- Resumo dos resultados da última verificação de confiabilidade, incluindo informação da substância de teste, da concentração e do veículo usado

- Dados de CP simultâneo ou histórico e de CN simultâneo para o laboratório
- Se um CP simultâneo não foi incluído, deve-se incluir a data e o relatório do laboratório para o CP periódico mais recente e um relatório detalhando os dados do CP histórico para o laboratório, justificando a base para não conduzir um CP simultâneo

Resultados:

• Peso individual dos camundongos no começo da dosagem e na morte programada; assim como a determinação do erro médio e associado (como SD, SEM) para cada grupo de tratamento

- Período do aparecimento e sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da administração, se alguma, para cada animal
- Uma tabela dos valores de DPM de cada camundongo individual (para abordagem individual) ou médio (para abordagem do tratamento agrupado) e valores IE para cada grupo de tratamento
- A determinação da média e o erro associado (como SD, SEM) para DPM/camundongo para cada grupo de tratamento e os resultados de análise dos outliers para cada grupo de tratamento, quando a abordagem individual é usada
- IE calculado e a medida apropriada da variabilidade que considere a variabilidade interanimal, tanto nas substâncias de teste, quanto no grupo de controle ao se utilizar a abordagem individual
- Relação dose-resposta
- Análise estatística, quando apropriado

Discussão de resultados:

• Um comentário breve sobre os resultados, a análise dose-resposta e a análise estatística, quando necessário, com uma conclusão sobre a substância em teste, se ela deve ser considerada um sensibilizador de pele

LITERATURA

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

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

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

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

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

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

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

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitizing potencyo flow molecular weight chemical susing a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, Toxicol., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of them urine local lymph node assay: II. Conclusion sander commendations of an in dependent scientific peer review panel, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34: 258-273.

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

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

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

(13) OECD (1992), Skin Sensitis ation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/tesGTuidelines]

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

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

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

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

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

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Meth-

ods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(35) OECD (1987), Acute Dermal Toxicity, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/tesGTuidelines]

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

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

ANEXO 1

Padrões de desempenho para a avaliação de métodos propostos de teste de llna semelhantes ou modificados para a sensibilização cutânea

INTRODUÇÃO

1. A finalidade dos Padrões de Desempenho (PD) é atender a base pela qual novos métodos e ensaios, tanto próprios (ou seja, com direitos autorais, marca registrada, com registro), quanto não próprios, podem ser determinados com precisão e confiabilidade suficientes para propósitos dos testes específicos. Esses PD, baseados em métodos validados e aceitos, podem ser usados para avaliar a confiabilidade e a precisão de outros métodos semelhantes (coloquialmente chamados de testes "me-too", do inglês "eu também") que são baseados em princípios científicos similares e medem ou predizem os mesmos efeitos biológicos ou tóxicos[14].

2. Antes da adoção dos métodos modificados (ou seja, melhorias potenciais propostas para um método aprovado), deve haver uma avaliação para determinar o efeito das mudanças propostas no desempenho do teste e até que ponto tais mudanças afetam as informações disponíveis para os outros componentes do processo de validação. Dependendo do número e da natureza das alterações propostas, dos dados gerados e da documentação de suporte para essas alterações, elas devem ser submetidas ao mesmo processo de validação descrito para um novo teste ou, se apropriado, à avaliação limitada de confiabilidade e relevância usando o PD já estabelecido[14].

3. Métodos de teste semelhantes ou modificados, propostos para uso sob esta Diretriz de Ensaio, devem ser avaliados para determinar sua confiabilidade e precisão, usando produtos químicos que representam toda a faixa de pontuação do LLNA. Para evitar o uso indevido de animais, é altamente recomendável que os desenvolvedores de modelos entrem em contato com a OECD antes de iniciar os estudos de validação, de acordo com o PD e as orientações fornecidas neste TG (diretriz de teste).

4. Estes PD baseiam-se no PD harmonizado US-ICCVAM, EC-ECVAM e JaCVAM--Japonês(12), para avaliar a validade de versões similares ou modificadas do

LLNA. O PD consiste em componentes essenciais do método, substâncias de referência recomendadas e padrões de precisão e confiabilidade que o método de teste proposto deve atender ou exceder.

I. Componentes essenciais do método de teste

5. Para garantir que um método de ensaio LLNA semelhante ou modificado seja funcional e mecanicamente análogo ao LLNA, medindo o mesmo efeito biológico, os seguintes componentes devem ser incluídos no protocolo do ensaio:

- A substância em teste deve ser aplicada topicamente a ambas as orelhas do camundongo
- Proliferação de linfócitos deve ser medida nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em teste
- Proliferação de linfócitos deve ser medida durante a fase de indução do sensibilizador cutâneo
- Para as substâncias em testes, a maior dose selecionada deve ser a concentração máxima que não induza toxicidade sistêmica e/ou irritação excessiva local na pele do camundongo. Para substâncias de referência positiva, a maior dose deve ser, no mínimo, tão alta quanto os valores EC3 do LLNA correspondentes à substância teste de referência (ver tabela 1) sem produzir toxicidade sistêmica e/ou irritação excessiva local na pele do rato
- Um VC simultâneo deve ser incluído em cada estudo e, quando apropriado, um CP simultâneo deve ser usado também
- O mínimo de quatro animais por grupo de dose deve ser usado
- Devem-se coletar dados de animais individuais ou agrupados

Se qualquer um desses critérios não for cumprido, então esses PD não podem ser usados para validação de métodos de teste similares ou modificados.

II. Lista mínima de substâncias referência

6. Os PD harmonizados US-ICCVAM, EC-ECVAM e JaCVAM-Japonês[12] identificaram 18 substâncias de referência mínimas que devem ser usadas e quatro substâncias de referência opcionais que são incluídas no PS LLNA. Estas substâncias de referência opcionais são substâncias que produzem resultados falso-positivo ou falso-negativo no LLNA, quando comparadas a resultados de

humanos e cobaias (TG 406)[13]; portanto, fornecem a oportunidade de demonstrar desempenho igual ou melhor do que o LLNA. A seleção de critérios para identificar essas substâncias inclui:

- A lista de substâncias de referência representa os tipos de substâncias tipicamente testadas para o potencial de sensibilização cutânea e a gama de respostas que o LLNA é capaz de medir ou prever
- As substâncias têm estruturas químicas bem definidas
- Dados LLNA em cobaias (do TG 406)[13] e (quando possível) dados em humanos são disponíveis para cada substância e
- As substâncias estão prontamente disponíveis por uma fonte comercial

As substâncias de referência recomendadas estão descritas na tabela 1. Os estudos que usam as substâncias de referência propostas devem ser avaliados no veículo com o qual estão descritos na tabela 1. Em situações em que uma substância mencionada pode não estar disponível, outras substâncias que atendam aos critérios de seleção mencionados podem ser utilizadas, com justificativa adequada.

Tabela 1: Substâncias opcionais para demonstrar melhoria na performance relativa ao LLNA

No	Substância[1]	CAS NR	Estado físico	Veículo[2]	EC3 %[3]	N[4]	EC3 0,5x - 2,0x	Faixa real de EC3	LLNA vs. GP	LLNA vs. Humano
1	5-Cloro--2-metil-4-isotiazolin--3-ona (CMI) / 2-metil-4-isotiazolin--3-ona (MI)[5]	26172-55-4/ 2682-20-4	Líquido	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sólido	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloreto de cobalto	7646-79-9	Sólido	DMF	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoenugenol	97-54-4	Líquido	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Mercapto-benzotiazole	149-30-1	Sólido	DMSO	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Líquido	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+

No	Substância[1]	CAS NR	Estado físico	Veículo[2]	EC3 %[3]	N[4]	EC3 0,5x - 2,0x	Faixa real de EC3	LLNA vs. GP	LLNA vs. Humano
8	HCA	101-86-0	Líquido	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Líquido	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Benzoato de fenilo	93-99-2	Sólido	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Álcool cinâmico	104-54-1	Sólido	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinil de ureia	39236-46-9	Sólido	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metacrilato de metilo	80-62-6	Líquido	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenzeno	108-90-7	Líquido	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	Isopropanol	67-63-0	Líquido	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	Ácido láctico	50-21-5	Líquido	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	Salicilato de Metila	119-36-8	Líquido	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-
19	Lauril sulfato de sódio	151-21-3	Sólido	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	Dimetacrilato de etileno glicol	97-90-5	Líquido	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Xileno	1330-20-7	Líquido	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/**	+/-
22	Cloreto de níquel	7718-54-9	Sólido	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Abreviações: AOO = acetona: azeite (4:1, p/v) (do inglês, acetone: olive oil); CAS = Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-dimetilformamida; DMSO = Dimetilsulfóxido; DNCB = 2,4-dinitroclorobenzeno; EC3 = concentração estimada necessária para produzir um índice de estimulação de 3; GP = resultado do teste com cobaia (TG 406) (13); HCA = Hexilcinamaldeído; Liq = Líquido; LLNA = resultado de ratos do ensaio de gânglio linfático local (TG 429)[(1)]; MEK = Butanona (do inglês, methylethylketone); NA = não aplicável já que o índice de estimulação é menor do que 3; NC = não calculado já que dados foram obtidos de um único estudo; Sol = Sólido; Veh = Veículo teste.

1. Substância teste deve ser preparada diariamente, a não ser que dados demonstrem estabilidade aceitável para armazenar.

2. Devido ao impacto potencial de diferentes veículos no desempenho do LLNA, o veículo recomendado para cada substância de referência deve ser utilizado[(24)(32)].

3. Valor médio em que mais de um valor de EC3 estava disponível. Para substâncias negativas (isto é, com índice de estimulação <3), a concentração mais alta testada é fornecida.

4. Número de estudos LLNA em que dados foram obtidos.

5. Comercialmente disponível como Kathon CG (no CAS 55965-84-9), que é uma mistura de 3:1 de CMI e MI. As concentrações relativas de cada componente variam de 1,1% a 1,25% (CMI) e 0,3% a 0,45% (MI). Os componentes inativos são sais de magnésio (21,5% a 24%) e nitrato de cobre (0,15% a 0,17%), com a formulação remanescente de 74% a 77% de água. O Kathon CG está prontamente disponível através da Sigma-Aldrich e da Rohm and Haas (agora Dow Chemical Corporation).

*= Presume-se que seja um não sensibilizador em humanos, com base no fato de que nenhum resultado de teste de contato clínico foi localizado, não está incluído como um alérgeno de kit de teste de contato e nenhum relato de casos de sensibilização humana foi localizado.

** = Dados GP não disponíveis.

III. Confiabilidade definida e padrões de precisão

7. A precisão de um método de teste LLNA, similar ou modificado, deve atender ou exceder à precisão do LLNA PS, quando ele é avaliado usando-se as 18 substâncias mínimas de referência. Um método novo ou modificado deve resultar na classificação correta, baseada em uma decisão do tipo "sim/não", ou seja, em dados absolutos. No entanto, o método novo ou modificado pode não classificar corretamente todas as substâncias de referência mínimas. Por exemplo, se um dos sensibilizadores fracos for erroneamente classificado, uma justificativa para o erro de classificação e para os dados adicionais apropriados pode ser considerada para demonstrar um desempenho equivalente. Como exemplo: dados adicionais, teríamos resultados de testes que fornecem classificações corretas para outras substâncias com propriedades físicas, químicas e sensibilizantes semelhantes às da substância de referência classificada incorretamente. Em tais circunstâncias, o status de validação do método de teste LLNA novo ou modificado seria avaliado caso a caso.

Reprodutibilidade Intralaboratorial

8. Para determinar a reprodutibilidade intralaboratorial, deve ser avaliado um método novo ou modificado de LLNA, utilizando uma substância sensibilizante bem caracterizada no LLNA. Portanto, o LLNA PD baseia-se na variabilidade dos resultados de testes repetidos de hexilcinamaldeído (HCA). Para avaliar a confiabilidade intralaboratorial, os valores de concentração estimada limiar (ECt) para HCA devem ser derivados em quatro ocasiões separadas com pelo menos uma semana entre os testes. A produtibilidade intralaboratorial aceitável é indicada pela capacidade de um laboratório obter, em cada teste de HCA, valores de ECt entre 5% e 20%, o que representa o intervalo de 0,5 a 2,0 vezes o EC3 médio especificado para HCA (10%) no LLNA (ver tabela 1).

Reprodutibilidade Interlaboratorial

9. A reprodutibilidade interlaboratorial de um método de ensaio LLNA novo ou modificado deve ser avaliada utilizando-se duas substâncias sensibilizantes bem caracterizadas no LLNA. O LLNA PD baseia-se na variabilidade dos resultados de testes de HCA e 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) em diferentes laboratórios. Os valores de ECt devem ser derivados independentemente de um único estudo, conduzido em, pelo menos, três laboratórios separados. Para demonstrar a replicabilidade interlaboratorial aceitável, cada laboratório deve obter valores de ECt de 5% a 20%, para o HCA, e de 0,025% a 0,1%, para o DNCB, que representam a faixa de 0,5 a 2,0 vezes a média das concentrações de EC3 especificadas para HCA (10%) e DNCB (0,05%), respectivamente, no LLNA (ver tabela 1).

ANEXO 2

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método e os valores de referência aceitos. É uma medida de desempenho do método e um aspecto de relevância. O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância" para significar a proporção de resultados corretos de um método [(14)].

Substância teste de referência: uma substância sensibilizante ou não sensibilizante usada como padrão para comparação com uma substância em teste. Uma substância de referência deve ter as seguintes propriedades: (i) fonte(s) consistente(s) e confiável(is); (ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de

substâncias testadas; (iii) características físico-químicas conhecidas; (iv) dados de suporte sobre efeitos conhecidos; e (v) potência conhecida na faixa da resposta desejada.

Limite da Concentração estimada (ECt): concentração estimada de uma substância em teste necessária para produzir um índice de estimulação que seja indicativo de uma resposta positiva.

Concentração estimada 3 (EC3): concentração estimada de uma substância de teste necessária para produzir um índice de estimulação ≥ 3.

Falso negativo: uma substância em teste incorretamente identificada como negativa ou inativa por um método, quando na verdade é positiva ou ativa.

Falso positivo: uma substância em teste incorretamente identificada como negativa ou inativa por um método, quando na verdade é positiva ou ativa.

Risco: o potencial para um efeito adverso na saúde ou na ecologia. O efeito adverso manifesta-se apenas se houver uma exposição em nível satisfatório.

Reprodutibilidade Interlaboratorial: medida do grau em que diferentes laboratórios qualificados, usando o mesmo protocolo e avaliando as mesmas substâncias de teste, podem produzir resultados qualitativos e quantitativos semelhantes. A reprodutibilidade interlaboratorial é determinada durante os processos de pré-validação e validação e indica até que ponto um teste pode ser transferido com sucesso entre laboratórios; também é referida como replicabilidade entre laboratórios[14].

Reprodutibilidade Intralaboratorial: determinação da extensão em que pessoas qualificadas, dentro do mesmo laboratório, podem repetir com sucesso os resultados, usando um protocolo específico em momentos diferentes. Também é referida como reprodutibilidade dentro do laboratório[14].

Teste Me-Too: uma expressão coloquial para um método de teste que é estrutural e funcionalmente semelhante a um método de teste de referência validado e aceito. Esse método de teste seria um candidato para validação de atualização. Também é usado com método de teste similar [14].

Outlier: um outlier é uma observação que é marcadamente diferente de outros valores em uma amostra aleatória de uma população.

Padrões de Desempenho (PD): padrões fundamentados em um método validado, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método proposto, que é funcional e mecanicamente semelhante. São incluídos: (i) componentes essenciais do método; (ii) uma lista mínima de Produtos Químicos de Referência, selecionados dentre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método validado; e (iii) com base no que foi obtido para o método validado, os níveis semelhantes de exatidão e confiabilidade que o método de teste proposto deve demonstrar, quando avaliados usando-se a lista mínima de Químicos de Referência [14].

Métodos próprios: um método para o qual a fabricação e a distribuição são restritas por patentes, direitos autorais, marcas registradas, etc.

Garantia de qualidade: um processo de gerenciamento pelo qual a adesão aos padrões de teste de laboratório, os requisitos e procedimentos de manutenção de registros e a precisão da transferência de dados são avaliados por indivíduos que são independentes daqueles que realizam o teste.

Produtos químicos de referência: produtos químicos selecionados para uso no processo de validação, para os quais as respostas já são conhecidas, quer seja no sistema de teste de referência *in vitro* ou *in vivo* ou nas espécies de interesse. Esses produtos químicos devem ser representativos das classes de produtos químicos, para os quais se espera usar o método, e devem representar toda a gama de respostas esperadas desses produtos, quando forem aplicados – de forte a fraco ou negativo. Diferentes conjuntos de produtos químicos de referência podem ser necessários para os diferentes estágios do processo de validação e para os diferentes métodos de teste e usos de teste[14].

Relevância: descrição da relação do teste com o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a medida de que o teste confere ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. A relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[14].

Confiabilidade: medidas da extensão em que um método de teste pode ser executado reprodutivelmente, dentro e entre laboratórios, ao longo do tempo, usando o mesmo protocolo. Avalia-se calculando a reprodutibilidade intra e interlaboratorial [14].

Sensibilização cutânea: processo imunológico resultante da exposição tópica de um indivíduo suscetível a um alérgeno indutor químico, provocando uma resposta cutânea imune que pode levar ao desenvolvimento de sensibilização por contato.

Índice de Estimulação (IE): um valor calculado para avaliar o potencial de uma substância em teste para sensibilização cutânea; é a razão entre a proliferação em grupos tratados pela proliferação do grupo de controle de veículo simultâneo.

Substância em teste: qualquer material testado usando-se este TG, seja um composto único ou múltiplos componentes (por exemplo, produtos finais, formulações). Ao testar formulações, deve-se considerar o fato de que certas autoridades regulatórias exigem apenas testes da formulação do produto final. No entanto, também podem existir requisitos de teste para o(s) ingrediente(s) ativo(s) de uma formulação de produto.

Método validado: um método para o qual os estudos de validação foram concluídos para determinar a relevância (incluindo precisão) e a confiabilidade para um propósito específico. É importante notar que um método validado pode não ter desempenho suficiente, em termos de precisão e confiabilidade, para ser considerado aceitável para o propósito apontado[14].

Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 442A

Sensibilização cutânea: ensaio dos gânglios linfáticos locais: DA

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OECD para o Teste de Substâncias Químicas são revisadas periodicamente devido ao progresso científico, às mudanças nas necessidades regulatórias e às considerações sobre o bem-estar animal. A primeira Diretriz de Teste (TG, do termo em inglês "Test Guideline") para a determinação da sensibilização cutânea em rato, o Ensaio de Gânglios Linfáticos Locais (LLNA; DIRETRIZ 429), foi adaptada em 2002 e revista[1]. Os detalhes da validação do LLNA e uma revisão do trabalho associado foram publicados[2-9]. No LLNA, a timidina ou o iodo radioisotópico é usado para medir a proliferação de linfócitos e, portanto, o ensaio tem uso limitado em regiões onde a aquisição, o uso ou o descarte de radioatividade é problemático. O LLNA: DA (desenvolvido por Daicel Chemical Industries, Ltd.) é uma modificação não radioativa para o LLNA, que quantifica o conteúdo de trifosfato de adenosina (ATP), via bioluminescência, como um indicador da proliferação de linfócitos. O método de teste LLNA:DA foi validado, revisado e recomendado por um painel internacional de revisão por experts e considerado útil para identificar substâncias sensibilizantes e não sensibilizantes cutâneas, com algumas limitações[10-13]. Esta Diretriz foi desenvolvida para avaliar o potencial de sensibilização cutânea de produtos químicos em animais. A Diretriz 406 utiliza testes em cobaias, principalmente o teste de maximização de cobaias e o teste de Buehler[14]. O LLNA (DIRETRIZ 429) e as duas modificações não radioativas, LLNA: DA (DIRETRIZ 442 A) e LLNA: BrdU-ELISA (DIRETRIZ 442 B), proporcionam uma vantagem sobre os testes de cobaia da Diretriz 406[14] em termos de redução e refinamento do uso de animais.

2. Semelhantemente ao LLNA, o LLNA: DA estuda a fase de indução da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação de dose-resposta. Entretanto, a capacidade de detectar sensibilizadores cutâneos sem a necessidade de utilizar um marcador radioativo para o DNA elimina o potencial de exposição ocupacional a problemas de radioatividade e eliminação de

resíduos. Isto, por sua vez, pode permitir o aumento do uso de camundongos para detectar sensibilizadores cutâneos, o que poderia reduzir ainda mais o uso de cobaias para testar o potencial de sensibilização cutânea (DIRETRIZ 406)[14].

DEFINIÇÕES

3. Definições usadas são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O LLNA: DA é um método LLNA modificado para identificar substâncias de teste potenciais expressivamente sensibilizantes da pele, com limitações específicas. Isto não implica necessariamente que em todos os casos o LLNA: DA deva ser usado no lugar de testes LLNA ou cobaias (DIRETRIZ 406)[14], mas que o ensaio é de igual mérito e pode ser empregado como uma alternativa na qual os resultados positivos e negativos já não requeiram mais confirmação[10-11]. O laboratório deve considerar todas as informações disponíveis sobre a substância de teste antes de conduzir o estudo. Tal informação incluirá a identidade e a estrutura química da substância de ensaio, suas propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* na substância e os dados toxicológicos sobre substâncias de teste estruturalmente relacionadas. Esta informação deve ser considerada para determinar se o LLNA: DA é apropriado para a substância em estudo (dada à incompatibilidade de tipos limitados de substâncias de teste com o LLNA: DA [ver parágrafo 5]) e para auxiliar na seleção da dose.

5. O LLNA: DA é um método in vivo e, consequentemente, não elimina o uso de animais na avaliação da atividade de sensibilização alérgica de contato. Tem, no entanto, o potencial de reduzir a utilização de animais para este fim quando comparado com os testes em cobaias (DIRETRIZ 406)[14]. Contudo, o LLNA: DA oferece um refinamento substancial (menos dor e aflição) na maneira como os animais são usados para testes de sensibilização alérgica, já que, ao contrário da Diretriz 406, o LLNA: DA não requer reações de hipersensibilidade dérmica induzida por desafio. Apesar das vantagens do LLNA: DA sobre a Diretriz 406[14], existem certas limitações que podem exigir o uso de DIRETRIZ 406 (por exemplo, o teste de certos metais, resultados falso-positivos com certos irritantes da pele

[como algumas substâncias do tipo surfactante][6,1], solubilidade da substância teste). Entretanto, as classes de substâncias de teste ou substâncias contendo grupos funcionais, que demonstraram atuar como potenciais causadores de confusão[16], podem necessitar do uso de testes de cobaia (ou seja, Diretriz 406[14]). Recomenda-se aplicar as limitações identificadas para o LLNA(1) ao LLNA: DA[10]. O uso do LLNA: DA pode não ser apropriado para testar substâncias que afetam os níveis de ATP (por exemplo, substâncias que atuam como inibidores de ATP) ou aquelas que afetam a medição precisa de ATP intracelular (presença de enzimas degradantes de ATP ou presença de ATP extracelular no gânglio linfático). À parte essas limitações, o LLNA: DA deve ser aplicável no teste de quaisquer substâncias, a menos que existam propriedades associadas às substâncias que possam interferir com a precisão do LLNA: DA. Deve-se considerar a possibilidade de resultados positivos limítrofes quando são obtidos valores do Índice de Estimulação (SI) entre 1,8 e 2,5 (ver parágrafos 31-32). Isto é baseado no banco de dados de validação de 44 substâncias usando-se SI ≥1,8 (ver parágrafo 6) para o qual o LLNA: DA identificou corretamente todos os 32 sensibilizadores LLNA, mas identificou, incorretamente, três dos 12 não sensibilizadores do LLNA com valores SI entre 1,8 e 2,5 (ou seja, limítrofe positivo)[10]. No entanto, como o mesmo conjunto de dados foi usado para definir os valores SI e calcular as propriedades preditivas do teste, os resultados declarados podem ser uma superestimação das propriedades preditivas reais.

PRINCÍPIO DO TESTE

6. O princípio básico subjacente ao LLNA: DA é que os sensibilizadores induzem a proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes, no local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dose e à potência do alérgeno aplicado e proporciona um meio simples de obter uma medição quantitativa da sensibilização. A proliferação é medida comparando-se a multiplicação média em cada grupo de teste com a propagação média no grupo de controle, tratado com veículo (VC). A razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e no grupo VC concomitante, denominado Índice de Estimulação (SI), é determinada e deve ser ≥1,8, antes que outras avaliações da substância teste potencialmente sensibilizante sejam executadas. Os métodos descritos aqui se baseiam no uso da medição do conteúdo de ATP pela bioluminescência (conhecida por correlacionar com o número de células vivas)[17] para indicar o aumento no número de células proliferativas nos gânglios linfáticos auriculares[18,19].

O método bioluminescente utiliza a enzima luciferase para catalisar a formação de luz a partir de ATP e luciferina, de acordo com a seguinte reação:

A intensidade da luz emitida está linearmente relacionada com a concentração de ATP e é medida usando-se um luminômetro. O ensaio de luciferina-luciferase é um método sensível para quantificação de ATP usado em uma ampla variedade de aplicações[20].

DESCRIÇÃO DO ENSAIO

Seleção da espécie animal

7. O camundongo é a espécie de escolha para este teste. Estudos de validação para o LLNA: DA foram conduzidos exclusivamente com a raça CBA/J, que é, portanto, considerada a raça preferida[12,13]. São utilizados camundongos fêmeas, adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre 8 e 12 semanas de idade e a variação de peso dos animais deve ser mínima e não exceder 20% do peso médio. Alternativamente, outras raças e machos podem ser utilizados quando são produzidos dados suficientes para demonstrar que não existem diferenças significativas da raça e/ou do gênero na resposta LLNA: DA.

Condições de acomodação e alimentação

8. Os camundongos devem ser alojados em grupo[23], a menos que seja fornecida uma justificativa científica adequada para o alojamento de camundongos individualmente. A temperatura da sala experimental do animal deve estar em 22 ± 3°C. Embora a umidade relativa deva ser de, pelo menos, 30% e preferivelmente não exceder 70%, a não ser durante a limpeza do quarto, o objetivo deve ser mantê-la entre 50 e 60%. A iluminação deve ser artificial, sendo a sequência de 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Para alimentação, as dietas convencionais de laboratório podem ser usadas, com suprimento ilimitado de água potável.

Preparação de animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de forma indolor, para permitir a identificação individual (mas não por marcação auricular) e mantidos em suas gaiolas por, pelo menos, cinco dias antes do início da dosagem, para permitir a aclimatação às condições laboratoriais. Antes do início do ensaio, to-

dos os animais são examinados, para garantir que não tenham lesões cutâneas observáveis.

Preparação da solução das doses

10. Substâncias sólidas de teste devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes/veículos e diluídas, se apropriado, antes da aplicação na orelha do camundongo. As substâncias de teste líquidas podem ser aplicadas puras ou diluídas antes da dosagem. Substâncias insolúveis, como aquelas geralmente vistas em dispositivos médicos, devem ser submetidas à extração exaustiva, em solvente apropriado, para revelar todos os constituintes extraíveis para teste, antes da aplicação à orelha do camundongo. As substâncias de teste devem ser preparadas diariamente, a menos que os dados de estabilidade demonstrem a aceitabilidade do armazenamento.

Verificação de confiabilidade

11. Os controles positivos (PC) são utilizados para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, respondendo com uma sensibilidade adequada e replicável a uma substância de teste de sensibilização para a qual a magnitude da resposta é bem caracterizada. Recomenda-se a inclusão de um PC simultâneo, pois demonstra a competência do laboratório para realizar com sucesso cada ensaio e permite uma avaliação da reprodutibilidade e da comparabilidade dentro e entre laboratório(s). Um PC para cada estudo também é exigido por algumas autoridades reguladoras e, portanto, os usuários são encorajados a consultar as autoridades relevantes antes de conduzir o LLNA: DA. Consequentemente, o uso rotineiro de um PC concorrente é encorajado, objetivando evitar a necessidade de testes adicionais em animais, para atender a tais requisitos que possam surgir do uso de um PC periódico (ver parágrafo 12). O PC deve produzir uma resposta positiva de LLNA: DA a um nível de exposição esperado para dar aumento no Índice de Estimulação (SI) >1,8 em relação ao grupo de controle negativo (NC). A dose de PC deve ser escolhida de modo a não causar irritação excessiva da pele ou toxicidade sistêmica. A indução é replicável, mas não excessiva (ou seja, SI>10). As substâncias de ensaio para PC preferidas são o hexilcinamaldeído a 25% ("Chemical Abstracts Service [CAS]" nº 101-86-0) e o eugenol a 25% (n° CAS 97-53-0) em acetona: azeite (4:1, v/v). Talvez existam circunstâncias nas quais, dada justificativa adequada, outra substância de teste PC possa ser usada, cumprindo-se os critérios acima.

12. Embora seja recomendada a inclusão de um grupo de PC concomitante, pode haver situações em que o teste periódico (isto é, a intervalos ≤ 6 meses) da substância de teste PC possa ser adequado para laboratórios que conduzem regularmente o LLNA: DA (conduzir o LLNA: DA com frequência não inferior a uma vez por mês) e tenham uma base de dados de PC histórica estabelecida, que demonstre a capacidade do laboratório de obter resultados reproduzíveis e precisos com os PC. A proficiência adequada com o LLNA: DA pode ser demonstrada com sucesso, gerando resultados positivos consistentes com o PC em, pelo menos, 10 testes independentes, dentro de período razoável (menos de um ano).

13. Um grupo de PC simultâneo deve sempre ser incluído quando houver mudança de procedimento no LLNA: DA (por exemplo, substituição no pessoal treinado, nos materiais do método de teste e/ou reagentes, no equipamento do método de teste, na origem dos animais de teste). Tais alterações devem ser documentadas em relatórios do laboratório. Deve-se considerar o impacto dessas mudanças na adequação do banco de dados histórico, previamente estabelecido, para determinar a necessidade de estabelecer um novo banco de dados para documentar a consistência nos resultados do PC.

14. Os pesquisadores devem estar cientes de que a decisão de conduzir um estudo de PC periodicamente, em vez de simultaneamente, tem ramificações sobre a adequação e a aceitabilidade dos resultados negativos do estudo gerados sem um PC concorrente, durante o intervalo entre estudos periódicos de PC. Por exemplo, se um resultado falso-negativo for alcançado no estudo periódico em PC, os resultados negativos obtidos entre o último estudo periódico de PC aceitável e o estudo de PC periódico inaceitável podem ser questionados. Implicações desses resultados devem ser cuidadosamente consideradas ao determinar se devem incluir PC simultâneos ou apenas conduzir PC periódicos. Deve-se considerar também o uso de menos animais no grupo PC concomitante, quando isso for cientificamente justificado e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos específicos, que menos camundongos podem ser usados[22].

15. Embora a substância de teste de PC deva ser testada no veículo conhecido por provocar resposta consistente (por exemplo, acetona: azeite; 4:1, v/v), podem ocorrer certas situações regulatórias nas quais também será necessário testar em veículo não padronizado (formulação clinicamente/quimicamente relevante)[24]. Se a substância de teste do PC simultâneo for testada num veículo

diferente da substância de teste, deve ser incluído um grupo de controle tratado com veículo (VC) separado para o PC concorrente.

16. Nos casos em que substâncias de uma classe química específica ou faixa de respostas estão sendo avaliadas, as substâncias de referência também podem ser úteis para demonstrar se o método de teste está funcionando adequadamente para detectar o potencial de sensibilização cutânea desses tipos de substâncias. As substâncias de referência apropriadas devem ter as seguintes propriedades:

- Semelhança estrutural e funcional com a classe da substância a ser testada
- Características físico-químicas conhecidas
- Dados suportes do LLNA: DA
- Dados suportes de outros modelos animais e/ou de humanos

PROCEDIMENTO DE TESTE

Número de animais e níveis de dose

17. Utiliza-se o mínimo de quatro animais por grupo de dose, com o mínimo de três concentrações da substância teste, mais um grupo de controle negativo (NC) simultâneo, tratado apenas com o veículo e um PC (simultâneo ou recente, baseado nas políticas do laboratório, considerando os parágrafos 11-15). O teste de doses múltiplas do PC deve ser considerado, especialmente ao avaliar o PC de forma intermitente. Exceto pela ausência de aplicação da substância de teste, os animais dos grupos de controle devem ser manuseados e tratados de maneira idêntica à dos animais nos grupos de tratamento.

18. A seleção de dose e veículo deve basear-se nas recomendações dadas nas referências[2,24]. As doses consecutivas são normalmente selecionadas de uma série de concentrações apropriadas, como 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, etc. Justificativa científica adequada deve acompanhar a seleção das séries de concentração usadas. Todas as informações toxicológicas existentes (toxicidade aguda e irritação dérmica), estruturais e físico-químicas sobre a substância de teste de interesse (e/ou substâncias de teste estruturalmente relacionadas) devem ser consideradas, quando disponíveis, selecionando as três concentrações consecutivas para que a concentração mais alta maximize a exposição, evitando toxicidade sistêmica e/ou irritação excessiva da pele local[24-25].

Na ausência de tal informação, pode ser necessário um teste inicial pré-triagem (ver parágrafos 21-24).

19. O veículo não deve interferir ou influenciar o resultado do ensaio e deve ser selecionado com base na maximização da solubilidade, a fim de obter a concentração mais elevada possível, produzindo simultaneamente uma solução/suspensão adequada para a aplicação da substância teste. Veículos recomendados são acetona: azeite (4:1, v/v), N,N-dimetilformamida, butanona (metiletilcetona), propilenoglicol e dimetilsulfóxido[6], mas outros podem ser usados se razões científicas suficientes forem fornecidas. Em certas situações, poderá ser necessário utilizar um solvente clinicamente relevante ou a formulação comercial na qual a substância de teste é comercializada como um controle adicional. Deve-se ter particular cuidado para assegurar que as substâncias hidrofílicas sejam incorporadas ao sistema de veículo, o qual molha a pele e não escorre imediatamente, pela incorporação de solubilizantes apropriados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1%). Assim, veículos totalmente aquosos devem ser evitados.

20. O processamento de gânglios linfáticos de camundongos individuais permite a avaliação da variabilidade interanimal e a comparação estatística da diferença entre a substância de teste e as medições do grupo VC (ver parágrafo 33). Portanto, avaliar a possibilidade de reduzir o número de camundongos no grupo PC é factível – quando dados individuais de animais são coletados[22]. Algumas autoridades reguladoras nacionais exigem a coleta de dados individuais sobre animais. A coleta regular de dados individuais proporciona uma vantagem em termos de bem-estar animal, evitando testes duplicados que seriam necessários se os resultados da substância de teste originalmente recolhidos por um modo (por exemplo, dados de animais agrupados) fossem, mais tarde, solicitados com outros requisitos (dados animais individuais).

Teste pré-triagem

21. Na ausência de informação para determinar a dose mais elevada a ser testada (ver parágrafo 18), deve ser realizado um teste pré-triagem para definir o nível de dose apropriado a testar no LLNA: DA. O objetivo do teste pré-triagem é fornecer orientações para a seleção do nível máximo de dose a utilizar no estudo LLNA: DA principal, quando não se tem informação sobre a concentração que induz toxicidade sistêmica (ver parágrafo 24) e/ou excessiva irritação local da pele (ver parágrafo 23). O nível máximo de dose testado deve ser de 100% da substância teste para líquidos ou a concentração máxima possível para sólidos ou suspensões.

22. O teste pré-triagem é realizado em condições idênticas às do estudo LLNA: DA principal, exceto que não há avaliação da proliferação de gânglios linfáticos e pode se utilizar menos animais por grupo de dose. Um ou dois animais por grupo de dose são sugeridos. Todos os camundongos serão observados diariamente para quaisquer sinais clínicos de toxicidade sistêmica ou irritação no local da aplicação. Os pesos corporais são registrados antes do teste e antes do término (dia 8). Ambas as orelhas de cada camundongo são observadas para eritema e pontuadas usando-se a tabela 1[25]. As medições da espessura da orelha são feitas usando-se um medidor de espessura (por exemplo, micrômetro digital ou medidor de espessura Peacock Dial) no Dia 1 (pré-dose), no Dia 3 (aproximadamente 48 horas após a primeira dose), no Dia 7 (aproximadamente 24 horas antes do término) e no Dia 8. Todavia, no dia 8, a espessura da orelha pode ser determinada pelo peso da punção, que deve ser realizada após os animais serem eutanasiados. A irritação local excessiva é indicada por um ponto de eritema ≥3 e/ou espessura de orelha ≥25% em qualquer dia de mensuração[26,27]. A dose mais elevada selecionada para o estudo principal LLNA: DA será a próxima dose mais baixa na série de concentrações pré-triagem (ver parágrafo 18) que não induza toxicidade sistêmica e/ou excessiva irritação local da pele.

Tabela 1: Pontos de eritema

Observação	**Ponto**
Sem eritema	0
Eritema bem fraco (quase imperceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema severo (vermelho próximo ao roxo) à formação de cicatriz impossibilitando a classificação do eritema	4

23. Além do aumento de 25% na espessura da orelha[26,27], o aumento estatisticamente significativo na espessura da orelha nos camundongos tratados, em comparação com camundongos controle, também foi usado para identificar irritações nos camundongos no LLNA[28-34]. No entanto, enquanto aumentos estatisticamente significativos podem ocorrer quando a espessura da orelha é inferior a 25%, eles não foram associados especificamente à irritação excessiva[30-34].

24. As seguintes observações clínicas podem indicar toxicidade sistêmica[35] quando usadas como parte de uma avaliação integrada e, portanto, podem indi-

car o nível máximo de dose a ser usado no LLNA: DA principal: mudanças na função do sistema nervoso (piloereção, ataxia, tremores e convulsões), alterações no comportamento (agressividade, atividade de limpeza, mudança marcada no nível de atividade), alteração nos padrões respiratórios (na frequência e na intensidade da respiração, como dispneia, respiração ofegante e estertores) e mudanças no consumo de alimentos e água. Portanto, devem ser considerados na avaliação sinais de letargia e/ou falta de responsividade, quaisquer sinais clínicos de dor ou angústia maior que leve ou momentânea, redução >5% no peso corporal do Dia 1 ao Dia 8 e mortalidade. Animais moribundos ou evidenciando dor ou mostrando sinais de sofrimento severo e duradouro devem ser eutanasiados[36].

Agenda experimental do estudo principal

25. Segue a agenda experimental para o ensaio:

- *Dia 1:* Identificar e registrar individualmente o peso de cada animal e qualquer observação clínica. Aplicar solução aquosa de Lauril-sulfato de sódio a 1% (SLS) no dorso de cada orelha, usando um pincel embebido na solução SLS para cobrir todo o dorso de cada orelha com quatro a cinco toques. Uma hora após a aplicação de SLS, aplicar 25µl da diluição apropriada da substância de teste, o veículo sozinho ou o PC (simultâneo ou recente, baseado na política de laboratório na consideração dos parágrafos 11-15), no dorso de cada orelha.
- *Dias 2, 3 e 7:* Repetir o pré-tratamento da solução aquosa de 1% de SLS e o procedimento de aplicação da substância de teste realizado no dia 1.
- *Dias 4, 5 e 6:* Sem tratamento.
- *Dia 8:* Registrar o peso de cada animal e qualquer observação clínica. Aproximadamente 24 a 30 horas após o início da aplicação no dia 7, os animais são eutanasiados. Extrair os gânglios linfáticos auriculares de drenagem de cada orelha de rato e processar separadamente em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para cada animal. Detalhes e diagramas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos podem ser encontrados na referência[22]. Para monitoramento adicional da resposta local da pele no estudo principal, podem ser incluídos, no protocolo do estudo, parâmetros adicionais, como pontos de eritema da orelha ou medidas da espessura da orelha (obtidas por meio de um medidor de espessura ou por determinação do peso da punção na necropsia).

Preparação da suspensão celular

26. De cada rato, uma suspensão unicelular de células de gânglios linfáticos (LNC, do inglês “Lymph Node Cells”), extraída bilateralmente, deve ser prepara-

da, colocando os gânglios linfáticos entre duas lâminas de vidro e aplicando uma leve pressão para esmagá-los. Depois de confirmar que o tecido se espalhou, separar as duas lâminas. Suspender o tecido de ambas as lâminas em PBS, segurando cada uma inclinada sobre a placa de Petri, e enxaguar com PBS, raspando simultaneamente o tecido da lâmina com um raspador. Os gânglios linfáticos nos animais NC são pequenos, portanto, a operação cuidadosa é importante para evitar quaisquer efeitos artificiais nos valores de SI. Um volume total de 1mL de PBS deve ser usado para enxaguar as duas lâminas. A suspensão de LNC na placa de Petri deve ser homogeneizada levemente com o raspador de células. Uma alíquota de 20μl da suspensão de LNC deve ser coletada com uma micropipeta, tomando cuidado para não absorver a membrana, que é visível; depois, misturar com 1,98mL de PBS para produzir uma amostra de 2mL. Uma segunda amostra de 2mL deve ser preparada, usando o mesmo procedimento, para que duas amostras sejam preparadas para cada animal.

Determinação da proliferação celular (medida do teor ATP dos linfócitos)

27. Os aumentos no teor de ATP nos gânglios linfáticos são medidos pelo método da luciferina/luciferase, usando-se um kit de medição de ATP, que mensura a bioluminescência em Unidades de Luminescência Relativa (RLU). O tempo do ensaio, desde o tempo de eutanásia do animal até a medição do conteúdo de ATP, para cada animal individual, deve ser mantido uniforme, dentro de aproximadamente 30 minutos, porque o conteúdo de ATP diminui gradualmente com o tempo após a eutanásia [12]. Assim, a série de procedimentos, desde a extração dos linfonodos auriculares até a medida do ATP, deve ser completada em 20 minutos, pelo horário pré-determinado, que deve ser o mesmo para cada animal. A luminescência de ATP deve ser medida em cada amostra de 2mL, de modo que duas medições de ATP sejam coletadas para cada animal. A luminescência média de ATP é determinada e usada em cálculos subsequentes (ver parágrafo 31).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Cada camundongo deve ser cuidadosamente observado, pelo menos, uma vez por dia para quaisquer sinais clínicos, quer de irritação no local da aplicação, quer de toxicidade sistêmica. Todas as observações são sistematicamente anotadas com registros mantidos para cada camundongo. Os planos de monitoramento devem incluir critérios para identificar prontamente, para eutanásia,

aqueles camundongos que apresentem toxicidade sistêmica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão cutânea[36].

Peso corporal

29. Como indicado no parágrafo 25, os pesos individuais dos animais devem ser medidos no início do teste e na eutanásia.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

30. Os resultados para cada grupo de tratamento são expressos pelo Índice de estimulação (SI) médio. O SI é produzido dividindo-se a RLU média/camundongo dentro de cada grupo de substância de teste e o grupo PC pela RLU média/camundongo para o solvente/grupo VC. O SI médio para os VC é 1.

31. O processo de decisão considera um resultado positivo quando SI $\geq$1,8[10]. No entanto, a força da relação dose-resposta, a significância estatística e a consistência das respostas solvente/veículo e das respostas PC também podem ser usadas para determinar se um resultado limítrofe (isto é, valor de SI entre 1,8 e 2,5) é declarado positivo[2-3,37].

32. Para uma resposta positiva limítrofe entre SI de 1,8 e 2,5, os usuários podem querer considerar informações adicionais, como relação dose-resposta, evidência de toxicidade sistêmica ou irritação excessiva e, quando apropriado, significância estatística junto com valores de SI, para confirmar que tais resultados são positivos[10]. Deve também ser dada atenção a várias propriedades da substância em estudo, incluindo se esta tem uma relação estrutural com sensibilizadores cutâneos conhecidos, se provoca uma irritação excessiva na pele do camundongo e a natureza da relação dose-resposta observada. Essas e outras considerações são discutidas em detalhes em outro momento[4].

33. A coleta de dados do camundongo individualmente possibilitará a análise estatística da presença e do grau de relação dose-resposta nos dados. Qualquer avaliação estatística pode incluir uma avaliação da relação dose-resposta, bem como comparações adequadamente ajustadas de grupos de teste (por exemplo, grupo doseado por pares versus comparações simultâneas de controle de solvente/veículo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, a regressão linear ou o teste de William, para avaliar as tendências de dose-resposta, e o teste

de Dunnett, para comparações de pares. Ao escolher um método apropriado de análise estatística, o investigador deve ter em mente possíveis desigualdades de variâncias e outros problemas relacionados, que podem exigir a transformação de dados ou a análise estatística não paramétrica. Em qualquer caso, o investigador pode precisar realizar cálculos de SI e análises estatísticas com e sem certos pontos de dados (às vezes chamados de "outliers" ou aberrações estatísticas).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os dados devem ser resumidos em tabelas mostrando os valores de RLU de cada animal, o RLU médio do grupo/animal, seu termo de erro associado (por exemplo, desvio-padrão, SEM) e o SI médio para cada grupo de dose comparado com o grupo de controle solvente/veículo concorrente.

Relatório de teste

35. O teste deve ser reportado com as seguintes informações:

Substância teste e controle de substâncias testes:

- Dados de identificação (como número CAS, se disponível; origem; pureza; impurezas conhecidas; número lote)
- Natureza física e propriedades físico-químicas (como volatilidade, estabilidade, solubilidade)
- Se for formulação, composição e porcentagens relativas de componentes Solvente/veículo:
- Dados de identificação (pureza; concentração, quando apropriado; volume usado)
- Justificativa para a escolha do veículo

Animais de teste:

- Origem dos ratos CBA
- Estado microbiológico dos animais, quando conhecido
- Número e idade dos animais
- Origem dos animais, condições de acomodação, etc.

Condições de Teste:

- A fonte, o número do lote e os dados de controle de qualidade/garantia de qualidade do fabricante para o kit ATP
- Detalhes da preparação e aplicação da substância em estudo
- Justificação para seleção de dose (incluindo resultados do teste pré-triagem, se realizado)
- Concentrações utilizadas no veículo e nas substâncias de teste e quantidade total de substância teste aplicada
- Detalhes da qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo e origem da dieta, fonte de água)
- Detalhes do tratamento e cronogramas de amostragem
- Métodos para medição de toxicidade
- Critérios para considerar os estudos como positivos ou negativos
- Detalhes de quaisquer desvios de protocolo e explicação sobre como o desvio afeta o desenho do estudo e os resultados

Checagem de Confiabilidade:

- Um resumo dos resultados da última checagem de confiabilidade, incluindo informações da concentração da substância teste e veículo usado
- Dados do PC simultâneo ou histórico e controle (de veículo/solvente) negativo simultâneo para o laboratório de teste
- Se um PC concorrente não for incluído, a data e o relatório do laboratório para o PC periódico mais recente e um relatório detalhando os dados históricos do PC para o laboratório, justificando a base para não conduzir um PC concorrente

Resultados:

- Pesos individuais de ratos no início da dosagem e na eutanásia; bem como, o termo de erro médio e associado (por exemplo, desvio-padrão, SEM) para cada grupo de tratamento
- Tempo do início e dos sinais de toxicidade, incluindo irritação cutânea no local da administração, se houver, para cada animal
- Hora da eutanásia dos animais e tempo de medição de ATP para cada animal
- Uma tabela de valores RLU de ratos individuais e valores de SI para cada grupo de tratamento de dose

- Termo de erro médio e associado (por exemplo, SD, SEM) para RLU/rato para cada grupo de tratamento e os resultados da análise de outlier (aberrações estatísticas) para cada grupo de tratamento
- SI calculado e uma medida apropriada de variabilidade que leve em conta a variabilidade interanimal em ambos os grupos (substância teste e de controle)
- Relação dose-resposta
- Análises estatísticas, quando apropriado

Discussão dos resultados:

- Um breve comentário sobre os resultados, a análise dose-resposta e as análises estatísticas, se apropriado, com uma conclusão sobre se a substância em estudo deve ser considerada um sensibilizador da pele

LITERATURA

1) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]
2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. FoodChem, Toxicol., 34, 999-1002.
3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. FoodChem, Toxicol., 34, 985-997.
4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitization tests. FoodChem. Toxicol., 36, 327-333.
5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitizing potency flow molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression methodthat includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.
6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

(ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

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

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

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

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

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

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

13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory

validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 11-26.

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

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

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

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

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

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

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

21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Careand Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

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

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

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

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

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

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

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

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

30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245256.

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO 1

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de relevância. O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância" para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste[38].

Substância teste de referência: uma substância sensibilizante ou não sensibilizante usada como padrão para comparação com uma substância de teste. Uma substância de referência deve ter as seguintes propriedades; (i) fonte(s) consistente(s) e confiável(is); (ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias testadas; (iii) características físico-químicas conhecidas; (iv) dados de suporte sobre efeitos conhecidos; e (v) potência conhecida na faixa da resposta desejada.

Falso negativo: uma substância de teste incorretamente identificada como negativa ou inativa por um método de teste, quando na verdade é positiva ou ativa.

Falso positivo: uma substância de teste incorretamente identificada como negativa ou inativa por um método de teste, quando na verdade é positiva ou ativa.

Risco: o potencial para um efeito adverso de saúde ou ecológico. O efeito adverso manifesta-se apenas se houver uma exposição de nível suficiente.

Replicabilidade Interlaboratorial: uma medida do grau em que diferentes laboratórios qualificados, usando o mesmo protocolo e testando as mesmas substâncias, podem produzir resultados qualitativa e quantitativamente semelhantes. A reprodutibilidade interlaboratorial é determinada durante os processos de pré-validação e validação e indica até que ponto um teste pode ser transferido com sucesso entre laboratórios; também referida como reprodutibilidade entre laboratórios[38].

Replicabilidade Intralaboratorial: uma determinação da medida em que pessoas qualificadas dentro do mesmo laboratório podem replicar com sucesso os resultados usando um protocolo específico em momentos diferentes. Também referida como reprodutibilidade dentro do laboratório[38].

Outlier: é uma observação que é marcadamente diferente de outros valores em uma amostra aleatória de uma população.

Garantia de qualidade: um processo de gerenciamento pelo qual a adesão aos padrões de teste de laboratório, requisitos e procedimentos de manutenção de registros, e a precisão da transferência de dados, são avaliados por indivíduos que são independentes daqueles que realizam o teste.

Confiabilidade: medidas da extensão em que um método de teste pode ser executado replicavelmente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, quando realizado usando o mesmo protocolo. Avalia-se calculando as reprodutibilidades intra e interlaboratorial[14].

Sensibilização cutânea: processo imunológico resultante quando um indivíduo suscetível é exposto topicamente a um alérgeno químico indutor, que provoca

uma resposta imune cutânea que pode levar ao desenvolvimento de sensibilização por contato.

Índice de Estimulação (SI): um valor calculado para avaliar o potencial de sensibilização cutânea de uma substância teste que é a razão da proliferação em grupos tratados pela do grupo de controle de veículo simultâneo.

Substância teste: qualquer material testado usando esta Diretriz, seja um composto único ou consistindo de múltiplos componentes (por exemplo, produtos finais, formulações). Ao testar formulações, deve-se considerar o fato de que certas autoridades regulatórias exigem apenas testes da formulação do produto final. No entanto, também podem existir requisitos de teste para o(s) ingrediente(s) ativo(s) de uma formulação de produto.

Diretrizes OECD para Teste de Substâncias Químicas - 442B

Ensaio de gânglio linfático local: BRDU-ELISA ou BRDU-FCM

INTRODUÇÃO

1. Um sensibilizante cutâneo refere-se a uma substância que leva à resposta alérgica após o contato repetido com a pele, conforme definido pelo Sistema Global Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas das Nações Unidas (ONUGHS)[1].

2. Existe consenso sobre os eventos biológicos-chave subjacentes à sensibilização cutânea. O conhecimento atual dos mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea foi resumido na forma de uma Via de Desfecho Adverso (AOP, Adverse Outcome Pathway, em inglês)[2], começando com o evento de iniciação molecular até os eventos intermediários ao efeito adverso, ou seja, dermatite alérgica de contato. Esta AOP foca-se em substâncias químicas que reagem com tiol (cisteína) e aminas primárias (lisina), tais como substâncias químicas orgânicas. Neste caso, o evento de iniciação molecular (o primeiro evento chave) é a ligação covalente de substâncias eletrofílicas a centros nucleofílicos nas proteínas da pele. O primeiro evento chave pode ser abordado usando-se o Ensaio de Reatividade Direta do Peptídeo (DPRA) *in chemico*, DIRETRIZ 442C[3]. O segundo evento chave nesta AOP ocorre nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como alterações na expressão gênica, associadas a vias específicas de sinalização celular, como as vias dependentes de antioxidante/elemento de resposta eletrófila (ARE). Este evento chave pode ser abordado usando-se os métodos de teste de luciferase ARE-Nrf2 *in vitro* (KeratinoSensTM ou LuSens), DIRETRIZ 442D[4]. O terceiro evento chave é a ativação de células dendríticas (DC), tipicamente avaliadas pela expressão de marcadores específicos de superfície celular, quimiocinas e citocinas, e pode ser abordado usando-se o Teste de Ativação de Linha Celular Humana *in vitro* (h-CLAT), o Teste de Ativação da Linha Celular U937 (U-SENS™) *in vitro* ou o ensaio de Gene relator de Interleucina-9 (Ensaio IL-8 Luc), como descrito na DIRETRIZ 442E[5]. O quarto evento chave é a proliferação de células T, que é avaliada indiretamente nos ensaios de Gânglio Linfático Local *in vivo* em camundongos (LLNA)[6].

3. A primeira diretriz a determinar a sensibilização cutânea do camundongo, o Ensaio de Gânglio Linfático Local (LLNA; DIRETRIZ 429), foi adotada em 2002 e desde então vem sendo revisada[7]. Os detalhes da validação do LLNA e uma revisão do trabalho associado foram publicados[8-16]. No LLNA, a timidina-radioisotópico (ou iodo) é usada para medir a proliferação de linfócitos e, portanto, o ensaio tem uso limitado em regiões onde a aquisição, o uso ou o descarte de radioatividade sejam problemáticos.

4. Esta Diretriz de Teste descreve duas modificações não radioativas para o método de teste LLNA que utilizam 5-bromo-2-desoxiuridina não radiomarcados (BrdU) (número CAS ["Chemical Abstracts Service"] 59-14-3) em ELISA [Ensaio de Imunoabsorção Enzimática] – ou sistema de teste baseado no FCM [Método de Citometria de Fluxo] para medir a proliferação de linfócitos:

- O ensaio de gânglio linfático local: BrdU-ELISA (Apêndice IA) e
- O ensaio de gânglio linfático local: BrdU-FCM (Apêndice IB)

5. Semelhantemente ao LLNA, o LLNA: BrdU-ELISA e o LLNA: BrdU-FCM estudam a fase de indução da sensibilização cutânea e fornecem dados quantitativos adequados para a avaliação dose-resposta. Além disso, a capacidade de detectar sensibilizadores cutâneos sem a necessidade de utilizar um marcador radioativo para o DNA elimina o problema potencial de exposição ocupacional a problemas de radioatividade e eliminação de resíduos. Isto, por sua vez, pode permitir o aumento do uso de camundongos para detectar sensibilizadores cutâneos, o que poderia reduzir ainda mais o uso de cobaias para testar o potencial de sensibilização cutânea (DIRETRIZ 406)[17].

6. Esta Diretriz de Teste foi desenvolvida para avaliar o potencial de sensibilização cutânea de substâncias químicas em animais. A Diretriz 406 utiliza testes em cobaias, notadamente o teste de maximização de cobaias e o teste de Buehler[17]. O LLNA (DIRETRIZ 429)[7] e as modificações não radioativas, LLNA: BrdU-ELISA, FCM (DIRETRIZ 442 B) e LLNA: DA (DIRETRIZ 442 A)[18], proporcionam vantagem sobre os testes com cobaias da DIRETRIZ 406[17] em termos de redução e refinamento do uso de animais.

LITERATURA

(1) UN, 2017. Globally Harmonised Sysem of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Seventh revised edition. United Nations, New York. Available at: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.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. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(3) OECD (2015), In Chemico Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442C, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(4) OECD (2015), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442D, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OECD (2017), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442E, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(6) OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

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

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

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

(11) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment

of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

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

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

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

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

(16) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(17) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A.Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

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

ANEXO I

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de relevância. O termo é frequentemente usado, de forma intercambiável, com "concordância" para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste[12].

AOP (Via de Desfechos Adversos): sequência de eventos, desde a estrutura química de uma substância química alvo ou grupo de substâncias químicas semelhantes, passando por evento de iniciação molecular, até um resultado *in vivo* de interesse[2].

Substância teste de referência: uma substância sensibilizante ou não sensibilizante usada como padrão para comparação com uma substância de teste. Uma substância de referência deve ter as seguintes propriedades; (i) fonte(s) consistente(s) e confiável(is); (ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias testadas; (iii) características físico-químicas conhecidas; (iv) dados de suporte sobre efeitos conhecidos; e (v) potência conhecida na faixa da resposta desejada.

Falso negativo: uma substância de teste incorretamente identificada como negativa ou inativa por um método de teste, quando na verdade é positiva ou ativa[12]. A taxa de falsos negativos é um indicador do desempenho do método de teste.

Falso positivo: uma substância de teste incorretamente identificada como negativa ou inativa por um método de teste, quando na verdade é positiva ou ativa[12]. A taxa de falsos positivos é um indicador do desempenho do método de teste.

Risco: propriedade inerente de uma agente ou situação para, potencialmente, causar efeitos adversos quando um organismo, um sistema ou uma (sub)população é exposto a esse agente.

Replicabilidade Interlaboratorial: uma medida do grau em que diferentes laboratórios qualificados, usando o mesmo protocolo e testando as mesmas substâncias

de teste, podem produzir resultados qualitativa e quantitativamente semelhantes. A Replicabilidade interlaboratorial é determinada durante os processos de pré-validação e validação e indica até que ponto um teste pode ser transferido com sucesso entre laboratórios; também referida como Replicabilidade entre laboratórios[12].

Replicabilidade Intralaboratorial: uma determinação da extensão em que pessoas qualificadas dentro do mesmo laboratório podem replicar com sucesso os resultados, usando um protocolo específico em momentos diferentes. Também referida como Replicabilidade dentro do laboratório[12].

Mistura: uma mistura ou uma solução composta de duas ou mais substâncias em que elas não reagem.

Substância monoconstituinte: uma substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um constituinte principal está presente em, pelo menos, 80% (p/p).

Substância multiconstituinte: uma substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual mais do que um constituinte principal está presente em concentração ≥10% (p/p) e <80% (p/p). Uma substância multiconstituinte é o resultado de um processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela combinação de duas ou mais substâncias sem reação química entre si, enquanto uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

Outlier: é uma observação que é marcadamente diferente de outros valores em uma amostra aleatória de uma população.

Padrões de Desempenho (PS): padrões, baseados em um método de teste validado, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método de teste proposto que é funcional e mecanicamente semelhante. Incluem: (i) componentes essenciais do método de teste; (ii) uma lista mínima de substâncias químicas de referência, selecionadas dentre as substâncias químicas utilizadas para demonstrar o desempenho aceitável do método de teste validado; e (iii) os níveis comparáveis de precisão e confiabilidade, com base no que foi obtido

para o método de teste validado; níveis que o método de teste proposto deve demonstrar quando avaliado usando-se a lista mínima de substâncias químicas de referência[12].

Substâncias químicas de proficiência: um subconjunto das substâncias químicas de referência, incluídas nos Padrões de Desempenho, que podem ser usadas pelos laboratórios para demonstrar competência técnica com um método de teste padronizado. Os critérios de seleção para essas substâncias geralmente incluem representar a faixa de respostas, estar disponíveis comercialmente e ter dados de referência de alta qualidade disponíveis.

Garantia de qualidade: um processo de gerenciamento pelo qual a adesão aos padrões de teste de laboratório, requisitos e procedimentos de manutenção de registros, bem como a precisão da transferência de dados, são avaliados por indivíduos independentes daqueles que realizam o teste.

Substâncias químicas de referência: um conjunto de substâncias químicas usadas para demonstrar a capacidade de um novo método de teste em atender aos critérios de aceitabilidade, demonstrados pelo(s) método(s) de teste de referência validado(s). Essas substâncias químicas devem ser representativas das classes de substâncias químicas para os quais se espera que o método de teste seja usado e devem representar toda a gama de respostas que podem ser esperadas das substâncias químicas para os quais ele pode ser usado, de fortes a fracas e a negativa.

Relevância: descrição da relação do teste com o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a medida que o teste confere ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[12].

Confiabilidade: medidas da extensão em que um método de teste pode ser executado e replicado dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, quando realizado usando o mesmo protocolo. Avalia-se calculando a Replicabilidade intra e interlaboratorial[12].

Replicabilidade: a concordância entre os resultados obtidos ao testar a mesma substância usando o mesmo protocolo de teste (ver confiabilidade)[12].

Análise ROC (Características Operacionais do Receptor): uma análise para definir um valor de corte ideal para o modelo de previsão. Os modelos de previsão, usando valores de corte, permitem que a substância química de teste seja categorizada como positiva ou negativa. Qualquer variação do valor de corte resultará em alterações da sensibilidade e da especificidade, em direções opostas. A análise ROC é comumente usada para obter valores de corte ideais para testes diagnósticos.

Sensibilidade: é a proporção de todas as substâncias químicas positivas/ativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[12].

Sensibilização cutânea: processo imunológico resultante quando um indivíduo suscetível é exposto topicamente a um alérgeno químico indutor, que provoca uma resposta imune cutânea que pode levar ao desenvolvimento de sensibilização por contato.

Especificidade: a proporção de todas as substâncias químicas negativas/inativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[12].

Índice de Estimulação (SI): um valor calculado para avaliar o potencial de uma substância química para sensibilização cutânea; é a taxa da proliferação em grupos tratados pela taxa do grupo de controle de veículo simultâneo.

Substância: elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo utilizado; exclui qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou alterar a sua composição[1].

Substância química teste: o termo "substância química teste" é usado para se referir ao que está sendo testado. Não está relacionado com a aplicabilidade dos métodos de ensaio, ao ensaio de substâncias monoconstituintes, substâncias multiconstituintes e/ou misturas.

UVCB: substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexa ou materiais biológicos.

Apêndice IA: Sensibilização cutânea *in vivo*: Ensaio de Gânglio Linfático local: BrdU-ELISA

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

1. O LLNA: BrdU-ELISA foi validado, revisado e recomendado por um painel científico internacional independente de revisão por pares, sendo considerado útil para identificar substâncias químicas para teste de sensibilização cutânea e não sensibilizantes, com certas limitações[1-3].

2. O LLNA: BrdU-ELISA é um método LLNA não radioativo, modificado para a identificação de substâncias químicas em potencial para sensibilização cutânea, com limitações específicas. Isto não implica necessariamente que, em todos os casos, o método LLNA: BrdU-ELISA deva ser utilizado em vez dos testes radioativos LLNA (DIRETRIZ 429) ou com cobaias (DIRETRIZ 406)[4], quando a utilização de um método *in vivo* for considerada necessária, mas sim que o ensaio é de igual mérito e pode ser empregado como uma alternativa na qual os resultados positivos e negativos geralmente não requeiram mais confirmação adicional[1,2]. O laboratório de testes deve considerar todas as informações disponíveis sobre a substância química em teste antes de conduzir o estudo. Tal informação incluirá: identidade e estrutura química da substância química em teste; suas propriedades físico-químicas; resultados de quaisquer outros testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* na substância química em estudo; e dados toxicológicos sobre substâncias químicas de teste estruturalmente relacionados. Esta informação deve ser considerada para determinar se o LLNA: BrdU-ELISA é apropriado para a substância química em estudo (dada a incompatibilidade de tipos limitados de substâncias químicas com o LLNA: BrdU-ELISA [ver parágrafo 3]) e para ajudar na seleção da dosagem.

3. O LLNA: BrdU-ELISA é um método *in vivo* e, como consequência, não eliminará o uso de animais na avaliação da atividade de sensibilização alérgica de contato. Portanto, deve-se considerar o domínio de aplicabilidade de métodos *in chemico* (ensaios abióticos que medem a reatividade química) *in vitro* e *in silico*

adequados e, consequentemente, a possibilidade de utilizar essas abordagens em vez de testes em animais. Tal como outros métodos de ensaio LLNA, o método LLNA: BrdU-ELISA tem, no entanto, o potencial de reduzir a utilização de animais para este fim quando comparado com os testes em cobaias (DIRETRIZ 406)[4]. Além disso, o LLNA: BrdU-ELISA oferece um refinamento substancial do modo pelo qual os animais são usados para testes de sensibilização alérgica de contato, já que, ao contrário da DIRETRIZ 406, o LLNA: BrdU-ELISA não requer que sejam feitas reações de hipersensibilidade dérmica induzidas por desafio. O LLNA: BrdU-ELISA também não requer o uso de um adjuvante, como é o caso do teste de maximização de cobaias[4]. Desta forma, o LLNA: BrdU-ELISA reduz o sofrimento dos animais. Apesar das vantagens do LLNA: BrdU-ELISA sobre a DIRETRIZ 406[4], existem certas limitações aplicáveis ao teste LLNA, que podem requerer o uso da DIRETRIZ 406 (por exemplo, o teste de alguns metais, resultados falso positivos com certos irritantes da pele [como algumas substâncias do tipo surfactante][5,6], solubilidade dos substâncias químicas de teste [como substâncias raramente solúveis ou não solúveis]). As classes de substâncias químicas, ou substâncias que contenham grupos funcionais que demonstraram atuar como potenciais variáveis de confusão (por exemplo, glutamato de ácido graxo, ácido oleico, éster de ácido oleico, álcool graxo 1, álcool graxo 2, siloxano poli-amino-funcional[7]), podem exigir o uso de cobaias (isto é, aplicar a DIRETRIZ 406[4]). Fora estas limitações que foram identificadas para o LLNA[6] também foram recomendadas para aplicar ao LLNA: BrdU-ELISA[1]. O LLNA: BrdU-ELISA deve ser aplicável para testar quaisquer químicos de teste, a menos que existam propriedades associadas a estas substâncias que possam interferir com a precisão desse teste. Entretanto, deve-se considerar a possibilidade de resultados positivos limítrofes, quando se obtém valores do Índice de Estimulação (SI) entre 1,6 e 1,9 (ver parágrafos 31-32) no LLNA: BrdU-ELISA. Isto está baseado no banco de dados de validação de 43 substâncias usando-se SI $\geq$1,6 (ver parágrafo 6) para o qual o LLNA: BrdU-ELISA identificou corretamente todos os 32 sensibilizadores LLNA, mas reconheceu incorretamente 2 das 11 não sensibilizadoras com valores SI entre 1,6 e 1,9 (isto é, limítrofe positivo)[1]. No entanto, como o mesmo conjunto de dados foi usado para definir os valores SI e calcular as propriedades preditivas do teste, os resultados declarados podem ser uma superestimação das propriedades preditivas reais.

4. Ao cogitar o teste de misturas, substâncias químicas difíceis de testar (por exemplo, instáveis) ou substâncias químicas de teste que não estejam claramen-

te dentro do domínio de aplicabilidade descrito nesta Diretriz, deve-se considerar, antecipadamente, se os resultados de tais testes produzirão resultados que sejam significativos cientificamente.

5. Definições são fornecidas no anexo 1 da Introdução Geral.

PRINCÍPIO DO TESTE

6. O princípio básico subjacente ao LLNA: BrdU-ELISA é que os sensibilizadores induzem a proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos de drenagem no local da aplicação química do teste. Esta proliferação é proporcional à dose e à potência do alérgeno aplicado e proporciona um meio simples de se obter a medição quantitativa da sensibilização. A proliferação é medida comparando-se a proliferação média em cada grupo de teste com a proliferação média no grupo de controle tratado com veículo (VC). Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a do grupo VC simultâneo, denominado SI, e esta deve ser $\geq$1,6 antes que uma avaliação adicional da substância química em estudo como um potencial sensibilizador cutâneo seja garantida. Os métodos descritos aqui são baseados no uso da medição do conteúdo de BrdUna um aumento no número de células em proliferação nos gânglios linfáticos auriculares drenantes. BrdU é um análogo da timidina e é similarmente incorporado ao DNA das células em proliferação. A incorporação de BrdU é medida pelo ELISA, que utiliza um anticorpo específico para BrdU, que também é marcado com peroxidase. Quando o substrato é adicionado, a peroxidase reage com o substrato para produzir um produto colorido que é quantificado em uma absorção específica usando-se um leitor de placas de microtitulação.

DESCRIÇÃO DO ENSAIO

Seleção da espécie animal

7. O camundongo é a espécie de escolha para este teste. Estudos de validação para o LLNA: BrdU-ELISA foram conduzidos exclusivamente com a raça CBA/JN, que é, portanto, considerada a raça preferida[1,3]. São utilizados camundongos fêmeas, adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre 8 e 12 semanas de idade e a variação de peso dos animais deve ser mínima e não exceder 20% do peso médio. Em alternativa, podem ser utili-

zadas outras raças ou machos, quando são produzidos dados suficientes para demonstrar que não existem diferenças significativas específicas de raça e/ou de sexo na resposta LLNA: BrdU-ELISA.

Condições de acomodação e alimentação

8. Os camundongos devem ser mantidos em grupo[8], em jaulas de piso sólido[9] com substrato e material de nidificação adequados[10-13], a não ser que razão científica adequada para a alternativa de acomodação individual dos camundongos seja fornecida. A temperatura da sala experimental do animal deve ser 22 ± 3ºC. Embora a umidade relativa deva ser de, pelo menos, 30% e preferencialmente não exceder 70%, a não ser durante a limpeza do quarto, o objetivo deve ser manter entre 50 e 60%. A iluminação deve ser artificial, sendo a sequência de 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Para alimentação, as dietas convencionais de laboratório podem ser usadas, com suprimento ilimitado de água potável.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de forma indolor, para permitir a identificação individual, preferencialmente por grampos não invasivos[14,15], e mantidos em suas gaiolas por, pelo menos, 5 dias antes do início da dosagem, permitindo a aclimatação às condições laboratoriais. Antes do início do tratamento, todos os animais são examinados, para garantir que não tenham lesões cutâneas observáveis. Durante todos os exames, os camundongos devem ser manipulados usando-se métodos não aversivos, como usar copos ou tubos de manipulação (cupping/handlingtunnel)[16].

Preparação das soluções de dose

10. As substâncias químicas de testes sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes/veículos e diluídas, se apropriado, antes da aplicação em uma das orelhas do camundongo. As substâncias químicas de testes líquidas podem ser aplicadas puras ou diluídas antes da dosagem. Substâncias químicas insolúveis, como aquelas geralmente vistas em dispositivos médicos[35], devem ser submetidas à extração exaustiva em solvente apropriado para revelar todos os constituintes extraíveis para teste antes da aplicação em uma das orelhas do camundongo. As substâncias químicas de teste devem ser preparadas diariamente, a menos que os dados de estabilidade demonstrem a aceitabilidade do armazenamento.

Verificação de confiabilidade

11. Os controles positivos (PC) são utilizados para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, pela resposta, com sensibilidade adequada e replicável, a uma substância de teste de sensibilização para a qual a magnitude da resposta é bem caracterizada. Recomenda-se a inclusão de um PC simultâneo, pois demonstra a competência do laboratório para realizar com sucesso cada ensaio e permite a avaliação da Replicabilidade e comparabilidade dentro e entre laboratório(s). Um PC para cada estudo também é exigido por algumas autoridades reguladoras e, portanto, os usuários são encorajados a consultar as autoridades relevantes antes de conduzir o LLNA: BrdU-ELISA. Consequentemente, o uso rotineiro de um PC concorrente é encorajado, para evitar a necessidade de testes adicionais em animais para atender a tais requisitos que possam surgir do uso de um PC periódico (ver parágrafo 12). O PC deve produzir uma resposta positiva de LLNA: BrdU-ELISA a um nível de exposição esperado para dar aumento no Índice de Estimulação(SI) $>1,6$ em relação ao grupo VC (controle de veículo). A dose de PC deve ser escolhida de modo a não causar irritação excessiva da pele ou toxicidade sistêmica e a indução é replicável, mas não excessiva (ou seja, SI >14). As substâncias de ensaio para PC preferidas são hexilcinamaldeído a 25% ("Chemical Abstracts Service [CAS]" nº 101-86-0) e 25% eugenol (nº CAS 97-53-0) em acetona: azeite (4:1, v/v). Pode haver circunstâncias em que, dada justificativa adequada, outra substância de teste PC sejam utilizadas, cumprindo-se os critérios acima.

12. Embora seja recomendada a inclusão de um grupo de PC concomitante, pode haver situações em que o teste periódico (isto é, a intervalos ≤ 6 meses) da substância de teste de PC seja adequado para laboratórios que conduzem regularmente o LLNA: BrdU-ELISA (ou seja, conduzir o LLNA: BrdU-ELISA com frequência não inferior a uma vez por mês) e ter uma base de dados histórica de PC estabelecida, que demonstre a capacidade do laboratório de obter resultados reproduzíveis e precisos com PC. A proficiência adequada com o LLNA: BrdU-ELISA pode ser demonstrada com sucesso gerando-se resultados positivos consistentes com o PC em, pelo menos, 10 testes independentes realizados dentro de período razoável (menos de um ano).

13. Um grupo de PC simultâneo deve sempre ser incluído quando houver alteração de procedimento no LLNA: BrdU-ELISA (por exemplo, mudar pessoal treina-

do, substituir materiais do método de teste e/ou reagentes, troca de equipamento do método de teste, mudança na origem dos animais de teste), e tais alterações devem ser documentadas em relatórios de laboratório. Deve-se considerar o impacto dessas mudanças na adequação do banco de dados histórico previamente estabelecido para determinar a necessidade de estabelecer um novo banco de dados histórico para documentar a consistência nos resultados do PC.

14. Os pesquisadores devem estar cientes de que a decisão de conduzir um estudo de PC periodicamente, em vez de simultaneamente, tem ramificações sobre a adequação e a aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos gerados sem um PC concorrente durante o intervalo entre cada estudo periódico de PC. Por exemplo, se um resultado falso negativo for obtido no estudo periódico em PC, pode-se questionar os resultados negativos da substância de teste obtidos no intervalo entre o último estudo periódico de PC aceitável e o estudo de PC periódico inaceitável. Implicações desses resultados devem ser cuidadosamente consideradas ao determinar se devem incluir PC simultâneos ou apenas conduzir PC periódicos. Deve-se considerar, também, o uso de menos animais no grupo PC concomitante, quando isso for cientificamente justificado e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos específicos, que menos camundongos podem ser usados[17].

15. Embora a substância química de teste do PC deva ser testada no veículo que é conhecido por provocar resposta consistente (por exemplo, acetona: azeite; 4:1, v/v), pode haver certas situações regulatórias nas quais possa ser necessário testar em veículo não padronizado (formulação clinicamente/quimicamente relevante)[18]. Se a substância química de teste do PC simultâneo for testada em veículo diferente da substância de teste, deve ser incluído um grupo de controle tratado com veículo (VC) separado para o PC simultâneo.

16. Nos casos nos quais substâncias químicas de teste de uma classe química específica ou faixa de respostas estão sendo avaliadas, as substâncias químicas de teste de referência também podem ser úteis para demonstrar que o método de teste está funcionando adequadamente para detectar o potencial de sensibilização cutânea desses tipos de químicos teste. As substâncias químicas de teste de referência apropriadas devem ter as seguintes propriedades:

- Semelhança estrutural e funcional à classe da substância química de teste a ser testada

- Características físico-químicas conhecidas
- Dados suportes do LLNA: BrdU-ELISA
- Dados suportes de outros modelos animais e/ou de humanos

PROCEDIMENTO DE TESTE

Número de animais e níveis de dose

17. Utiliza-se o mínimo de quatro animais por grupo de dose, com o mínimo de três concentrações da substância química em estudo, mais um grupo VC simultâneo, tratado apenas com o veículo para a substância química em estudo, e um grupo PC (simultâneo ou recente, baseado na política laboratorial, em consideração aos parágrafos 11-15). O teste de doses múltiplas do PC deve ser considerado especialmente ao se testar o PC de forma intermitente. Exceto pela ausência de tratamento com a substância química em teste, os animais nos grupos de controle devem ser manipulados e tratados de maneira idêntica à dos animais nos grupos de tratamento.

18. A seleção de dose e veículo deve basear-se nas recomendações dadas nas referências[2,27]. As doses consecutivas são normalmente selecionadas de uma série de concentrações apropriadas, como 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, etc. Justificativa científica adequada deve acompanhar a seleção das séries de concentração usadas. Todas as informações toxicológicas existentes (por exemplo, toxicidade aguda e irritação dérmica) estruturais e físico-químicas sobre a substância de teste de interesse (e/ou substâncias de teste estruturalmente relacionadas) devem ser consideradas, quando disponíveis, na seleção de três concentrações consecutivas, de forma que a concentração mais alta maximize exposição, evitando toxicidade sistêmica e/ou irritação excessiva da pele local[19,20]. Na ausência de tal informação, pode ser necessário um teste inicial pré-triagem (ver parágrafos 21-24).

19. O veículo não deve interferir ou influenciar o resultado do ensaio e deve ser selecionado com base na maximização da solubilidade, a fim de obter a concentração mais elevada possível, produzindo simultaneamente uma solução/suspensão adequada para a aplicação da substância teste. Veículos recomendados são: acetona: azeite (4:1, v/v), N,N-dimetilformamida, butanona (metiletilcetona), propilenoglicol e dimetilsulfóxido[5], mas outros podem ser usados se razões cien-

tíficas suficientes forem fornecidas. Em algumas situações, poderá ser necessário utilizar um solvente clinicamente relevante ou uma formulação na qual a substância de teste é comercializada como um controle adicional. Deve-se ter particular cuidado para assegurar que as substâncias hidrofílicas sejam incorporadas ao sistema de veículo, de forma que molhe a pele e não escorra imediatamente, por incorporação de solubilizantes apropriados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1%). Assim, veículos totalmente aquosos devem ser evitados.

20. O processamento de gânglios linfáticos de camundongos individuais permite a avaliação da variabilidade interanimal e a comparação estatística da diferença entre a substância química de teste e as medições do grupo VC (ver parágrafo 33). Com isso, avaliar a possibilidade de reduzir o número de camundongos no grupo PC é factível somente quando dados individuais de animais são coletados[18]. Algumas autoridades reguladoras nacionais exigem a coleta de dados individuais sobre animais. A coleta regular de dados de animais individuais proporciona uma vantagem em termos de bem-estar animal, evitando testes duplicados – que seriam necessários se os resultados da substância de teste originalmente recolhidos de uma maneira (por exemplo, dados de animais agrupados) fossem considerados posteriormente, pelas autoridades reguladoras, com outros requisitos (dados animais individuais).

Teste pré-triagem

21. Na ausência de informação para determinar a dose mais elevada a ser testada (ver parágrafo 18), deve ser realizado um teste pré-triagem para definir o nível de dose apropriado a testar no LLNA: BrdU-ELISA. O objetivo do teste pré-triagem é fornecer orientações para a seleção do nível máximo de dose a ser utilizada no estudo LLNA: BrdU-ELISA principal, onde a informação sobre a concentração que induz toxicidade sistêmica (ver parágrafo 24) e/ou excessiva irritação local da pele (ver parágrafo 23) não está disponível. O nível máximo de dose testado deve ser de 100% da substância teste para líquidos ou a concentração máxima possível para sólidos ou suspensões.

22. A pré-triagem é realizada em condições idênticas às do estudo LLNA: BrdU--ELISA principal, exceto que não há avaliação da proliferação de gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dose. Um ou dois animais por grupo de dose são sugeridos. Todos os camundongos serão observados

diariamente para quaisquer sinais clínicos de toxicidade sistêmica ou irritação no local da aplicação. Os pesos corporais são registrados antes do teste e antes do término (dia 6). Ambas as orelhas de cada camundongo são observadas para eritema e pontuadas usando-se a tabela 1[25]. As medições da espessura da orelha são feitas usando-se um medidor de espessura (por exemplo, micrômetro digital ou medidor de espessura Peacock Dial) no Dia 1 (pré-dose), no Dia 3 (aproximadamente 48 horas após a primeira dose) e no Dia 6. Todavia, no dia 6, a espessura da orelha pode ser definida por determinações do peso da punção, que deve ser realizada após os animais serem eutanasiados. A irritação local excessiva é indicada por um ponto de eritema ≥3 e/ou espessura de orelha ≥25% em qualquer dia de mensuração[21,22]. A dose mais elevada selecionada para o estudo principal LLNA: BrdU-ELISA será a próxima dose mais baixa na série de concentrações pré-triagem (ver parágrafo 18) que não induza toxicidade sistêmica e/ou excessiva irritação local da pele.

Tabela 1: Pontos de eritema

Observação	Escore
Sem eritema	0
Eritema bastante leve (quase imperceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema de moderado a severo	3
Eritema severo (vermelho como beterraba) com formação de escaras que impedem a gradação do eritema	4

23. Além do aumento de 25% na espessura da orelha[21,22], o aumento estatisticamente significativo na espessura da orelha nos camundongos tratados, em comparação com camundongos controle, também foi usado para identificar irritações nos camundongos no LLNA[22-28]. Entretanto, enquanto aumentos estatisticamente significativos podem ocorrer quando a espessura da orelha é menor do que 25%, eles não foram associados especificamente à irritação excessiva[25,29]

24. As seguintes observações clínicas podem indicar toxicidade sistêmica[30] quando usadas como parte de avaliação integrada e, portanto, podem indicar o nível máximo de dose a ser usado no LLNA: BrdU-ELISA principal: alterações na função do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); diferenças no comportamento (agressividade, atividade de limpeza,

mudança marcada no nível de atividade); alterações nos padrões respiratórios (frequência e intensidade da respiração, tais como dispneia, respiração ofegante e estertores) e mudanças no consumo de alimentos e água. Também devem ser considerados na avaliação: sinais de letargia e/ou falta de responsividade, quaisquer sinais clínicos de dor ou angústia mais do que leve ou momentânea, redução >5% no peso corporal do Dia 1 ao Dia 6 e mortalidade. Animais moribundos ou animais evidenciando dor ou mostrando sinais de sofrimento severo e duradouro devem ser eutanasiados[31].

Agenda experimental do estudo principal

35. A agenda experimental do ensaio deve ser:

- Dia 1:

  Identificar e registrar individualmente o peso de cada animal e qualquer observação clínica. Aplicar 25μL da diluição apropriada da substância química em estudo, o veículo isolado ou o PC (simultâneo ou recente, com base na política de laboratório na consideração dos parágrafos 11-15), no dorso de cada orelha.

- Dias 2 e 3:

  Repetir o procedimento de aplicação começado no dia 1.

- Dia 4:

  Sem tratamento.

- Dia 5:

  Injetar 0,5mL (5mg/camundongo) de injeção intraperitoneal BrdU (10mg/mL).

- Dia 6:

  Registrar o peso de cada animal e qualquer observação clínica. Aproximadamente 24 horas após a injeção de BrdU, eutanasiar os animais. Extrair os gânglios linfáticos auriculares de drenagem de cada orelha de camundongo e processar separadamente em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para cada animal. Detalhes e diagramas de identificação e dissecação de gânglios podem ser encontrados na referência[17]. Para monitorar ainda mais a resposta local da pele no estudo principal, parâmetros adicionais, como pontuação do eritema da orelha ou medidas da espessura da orelha (obtidas por meio de um medidor de espessura ou determinação do peso da punção na necropsia) podem ser incluídos no protocolo do estudo.

Preparação de suspensões de célula

26. De cada camundongo, uma suspensão unicelular de células de gânglio linfático (LNC) excisada bilateralmente é preparada por desagregação mecânica suave, através de gaze de aço inoxidável de malha 200 micra ou outra técnica aceitável para gerar uma suspensão de célula única (por exemplo, utilização de almofariz de plástico para esmagar os gânglios linfáticos seguido de passagem através de uma malha de nylon # 70). O procedimento para preparar a suspensão de LNC é crítico neste ensaio e, portanto, todo operador deve adquirir a habilidade com antecedência. Os gânglios linfáticos nos animais VC são pequenos; portanto, a operação cuidadosa é importante para evitar quaisquer efeitos artificiais nos valores de SI. Em cada caso, o volume alvo da suspensão de LNC deve ser ajustado para um volume otimizado determinado (aproximadamente 15mL). O volume otimizado é baseado na obtenção de uma absorção média do grupo VC dentro de 0,1-0,2.

Determinação de proliferação celular (medida do teor de BrdU no DNA dos linfócitos)

27. BrdU é medido por ELISA, utilizando um kit comercial (por exemplo, no estudo de validação, foi utilizado o Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Outros kits BrdU-ELISA podem ser usados se fornecerem resultados consistentes. Resumidamente, 100μL da suspensão de LNC são adicionados aos poços de uma microplaca de fundo plano em triplicata. Após fixação e desnaturação do LNC, adiciona-se a cada poço o anticorpo anti-BrdU, conjugado com peroxidase e deixa-se reagir. Subsequentemente, o anticorpo anti-BrdU é removido por lavagem e se adiciona substrato, deixando produzir cromogênio. Então, se mede a absorção a 370nm com um comprimento de onda de referência de 492nm. Em todos os casos, as condições do ensaio devem ser otimizadas (ver parágrafo 26).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Cada camundongo deve ser cuidadosamente observado, pelo menos uma vez por dia, para quaisquer sinais clínicos, quer de irritação no local da aplicação, quer de toxicidade sistêmica. Todas as observações são sistematicamente anotadas nos registros, sendo mantidos para cada animal. Os planos de monitoramento devem incluir critérios para identificar prontamente aqueles camundongos que

apresentam toxicidade sistêmica, irritação excessiva da pele local ou corrosão da pele para a eutanásia[31].

Peso corporal

29. Como indicado no parágrafo 25, os pesos individuais dos animais devem ser medidos no início do teste e na eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

30. Os resultados para cada grupo de tratamento são expressos como o SI médio. O SI é derivado da divisão do índice de marcação médio BrdU/camundongo dentro de cada grupo de substância química de teste e o grupo PC, pelo índice de marcação BrdU médio para o grupo VC/solvente. Então, o SI médio para os VC é 1.

31. O índice de marcação BrdU é definido como:

32. índice de marcação BrdU = (ABSem – ABSemvazio) – (ABSref – ABSrefvazio)

33. Onde; "em" = comprimento de onda de emissão; e "ref" = comprimento de onda de referência.

34. O processo de decisão considera um resultado positivo quando SI $\geq$1,6[1]. No entanto, a força da relação dose-resposta, a significância estatística e a consistência das respostas solvente/veículo e PC também podem ser utilizadas para determinar se um resultado limítrofe (ou seja, um valor SI entre 1,6 e 1,9) é declarado positivo[5,32,33].

35. Para uma resposta positiva limítrofe entre SI de 1,6 e 1,9, os usuários podem querer considerar informações adicionais, tais como relação dose-resposta, evidência de toxicidade sistêmica ou irritação excessiva e, quando apropriado, significância estatística junto com valores de SI, para confirmar que tais resultados sejam positivos[1]. Deve-se considerar, também, várias propriedades da substância química em estudo, incluindo se ela tem relação estrutural com os sensibilizadores cutâneos conhecidos, se causa irritação excessiva da pele no camundongo e a natureza da resposta à dose observada. Essas e outras consi-

derações são discutidas em detalhes em outros lugares[34].

36. A coleta de dados do camundongo individual permitirá a análise estatística da presença e do grau de relação dose-resposta nos dados. Qualquer avaliação estatística pode incluir a avaliação da relação dose-resposta, bem como comparações adequadamente ajustadas de grupos de teste (por exemplo, grupo doseado por pares versus comparações de controle solvente/veículo simultâneo). Análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressão linear ou teste de William, para avaliar tendências dose-resposta, e teste Dunnett, para comparações de pares. Ao escolher um método apropriado de análise estatística, o investigador deve ter em mente as possíveis desigualdades de variância e outros problemas relacionados, que podem exigir a transformação de dados ou a análise estatística não paramétrica. Em qualquer caso, o investigador pode precisar realizar cálculos de SI e análises estatísticas com e sem certos pontos de dados (às vezes chamados de "aberrações estatísticas").

DADOS E RELATÓRIO

Dados

37. Os dados devem ser resumidos em tabelas, mostrando os valores do índice de rotulagem de BrdU em animais individualmente, o índice médio de rotulagem de BrdU do grupo/animal, seu erro associado (por exemplo, SD (desvio padrão), SEM (média do erro padrão)) e o SI médio para cada grupo de dose comparado com o grupo de controle de solvente/veículo.

Relatório de teste

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

Substância química de teste

- Origem, número de lote, dados limites para uso, se disponíveis
- Estabilidade da substância química teste, se conhecida

Substância monoconstituinte

- Aparência física, solubilidade da água e propriedades físico-químicas adicionais relevantes

- Identificação química, como nome IUPAC ou CAS, número CAS, SMILES ou código InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, quando apropriado e viável, etc.

Substância multiconstituintes, UVBC e misturas

- Caracterizado, na medida do possível, por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes.

Controles

- Dados de identificação (como número CAS, se possível; origem; pureza; impurezas conhecidas; número do lote)
- Natureza física e propriedades físico-químicas (como volatilidade, estabilidade e solubilidade)

Solvente/veículo

- Dados de identificação (pureza; concentração, quando apropriado; volume usado)
- Justificativa de escolha do veículo

Animais de teste

- Origem dos camundongos CBA
- Estado microbiológico dos animais, quando conhecido
- Número e idade dos animais
- Origem dos animais, condições de acomodação, dieta, etc.

Condições de teste

- Origem, número de lote e dados do controle/garantia de qualidade do fabricante (sensibilidade e especificidade do anticorpo e o limite de detecção) para o kit ELISA
- Detalhes da preparação e aplicação da substância química em teste
- Justificativa para a seleção da dose (incluindo resultados do teste pré-triagem, se conduzido)
- Concentrações usadas do veículo e da substância química em teste e a quantidade total da substância química de teste aplicada

- Detalhes da qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo/origem de dieta, fonte de água)
- Detalhes do tratamento e do cronograma de amostragem
- Métodos para a medida de toxicidade
- Critérios para considerar os estudos como positivos ou negativos
- Detalhes de qualquer desvio de protocolo e uma explicação de como o desvio afeta o desenho do estudo e os resultados

Verificação de confiabilidade

- Um resumo dos resultados da verificação de confiabilidade mais recente, incluindo informações sobre produto, substância química em teste, concentração, PC, VC (veículo de controle) e substância química de teste de referência usada, conforme apropriado
- PC simultâneo ou histórico e dados do VC simultâneo para laboratório de teste
- Se um PC simultâneo não for incluído, deverão ser fornecidos a data e o relatório do laboratório para o PC periódico mais recente, além de um relatório detalhando dados históricos do PC para o laboratório, justificando a base para não se conduzir um PC simultâneo

Resultados

- Pesos individuais dos camundongos no início da dosagem e na eutanásia programada, bem como a média e o erro associado (por exemplo, SD, SEM) para cada grupo de tratamento
- Período de aparecimento e sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da administração para cada animal, se houver
- Uma tabela de índices individuais de rotulagem de BrdU do camundongo e valores SI para cada grupo de tratamento
- Média e erro médio e associado (como SD, SEM) para índice de marcação BrdU/camundongo para cada grupo de tratamento e os resultados de análise de “outlier” para cada grupo de tratamento
- SI calculado e uma medida apropriada de variabilidade que leve em conta a variabilidade interanimal na substância química teste e nos grupos de controle
- Relação dose-resposta
- Análises estatísticas, quando apropriado

Discussão dos resultados

- Um breve comentário sobre os resultados, a análise dose-resposta e as análises estatísticas, quando apropriado, com uma conclusão sobre se a substância química em teste deve ser considerada um sensibilizante da pele

Literatura

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

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

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

(4) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

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

(6) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

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

(8) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(9) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C.

(10) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. Lab Animals 2002;36:243-270.

(11) Van Loo PLP, Kruitwagenb CLJJ, Koolhaasc JM, Van de Weerdd HA, Van Zutphena LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behavior and physiological parameters in male mice. Applied Animal Behaviour Science. 2002;76(1):65-81.

(12) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. Trends in Neuroscience. 2001;24:207-211.

(13) Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs. Published January 2007. https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichm entandsystematicrandomization.pdf. Accessed April 06, 2018

(14) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangenberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. Laboratory Animals. 2013;47:2-11.

(15) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf, Published 2008. Accessed 9 April 2018

(16) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. Nature Methods. 2010;7:825-826.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(35) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.

Apêndice IB: Sensibilizador de pele *in vivo*: o ensaio de gânglio linfático local: BrdU-FCM

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

1. O LLNA: O BrdU-FCM foi validado e recomendado, após uma revisão científica independente internacional, como sendo útil para identificar substâncias químicas de teste que sensibilizam a pele e as que não sensibilizam, com certas limi-

tações[1-4]. O estudo de validação para o LLNA: BrdU-FCM foi realizado em conformidade com os padrões de desempenho (PS) para avaliação de métodos de teste LLNA para a sensibilização cutânea, semelhantes ou modificados, no anexo 1 da Orientação da OECD para o teste de substâncias químicas, Sensibilização cutânea: Ensaio de gânglio linfático local (DIRETRIZ 429).

2. O LLNA: BrdU-FCM é um método LLNA não radioativo, modificado e usado na identificação de substâncias químicas com potencial para sensibilização cutânea, com limitações específicas. Isto não implica necessariamente que, em todos os casos, o método LLNA: BrdU-FCM deva ser utilizado, em vez dos testes radioativos LLNA (DIRETRIZ 429) ou com cobaias (DIRETRIZ 406)[5], quando a utilização de um método *in vivo* for considerada necessária. Mas significa que o ensaio é de igual mérito e pode ser empregado como uma alternativa, na qual os resultados positivos e negativos geralmente não requerem confirmação adicional[1,2]. O laboratório de testes deve considerar todas as informações disponíveis sobre a substância química em teste antes de conduzir o estudo. Tal informação incluirá a identidade e a estrutura química da substância em teste; suas propriedades físico-químicas; os resultados de quaisquer outros testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* na substância química em estudo; e os dados toxicológicos sobre substâncias químicas de teste estruturalmente relacionados. Esta informação deve ser considerada para determinar se o LLNA: BrdU-FCM é apropriado para a substância química em estudo (dada a incompatibilidade de tipos limitados de substâncias químicas com o LLNA: BrdU-FCM [ver parágrafo 3]) e para ajudar na seleção da dose.

3. O LLNA: BrdU-FCM é um método *in vivo* e, como consequência, não eliminará o uso de animais na avaliação da atividade de sensibilização alérgica de contato. Portanto, deve-se considerar o domínio de aplicabilidade de métodos *in vitro*, *in chemico* e *in silico* adequados e, consequentemente, a possibilidade de utilizar essas abordagens em vez de testes em animais. Tal como outros métodos de ensaio LLNA, o método LLNA: BrdU-FCM tem, no entanto, o potencial de reduzir a utilização de animais para este fim quando comparado com os testes em cobaias (DIRETRIZ 406)[5]. Todavia, o LLNA: BrdU-FCM oferece refinamento substancial do modo pelo qual os animais são usados para testes de sensibilização alérgica de contato, já que, ao contrário do previsto na DIRETRIZ 406, o LLNA: BrdU-FCM

não requer que reações de hipersensibilidade dérmica induzidas por desafio sejam feitas. Também, o LLNA: BrdU-FCM não requer o uso de um adjuvante, como é o caso do teste de maximização de cobaias[5]. Assim, o LLNA: BrdU-FCM reduz o sofrimento dos animais. Apesar das vantagens do LLNA: BrdU-FCM sobre a DIRETRIZ 406[5], existem certas limitações aplicáveis ao teste LLNA, que podem requerer o uso da DIRETRIZ 406 (por exemplo, o teste de certos metais, resultados falso positivos com certos irritantes da pele [como algumas substâncias do tipo surfactante][6,7], solubilidade dos substâncias químicas de teste [como substâncias raramente solúveis ou não solúveis]). No entanto, as classes de substâncias químicas ou substâncias que contenham grupos funcionais que demonstraram atuar como potenciais variáveis de confusão (glutamato de ácido graxo, ácido oleico, éster de ácido oleico, álcool graxo 1, álcool graxo 2, siloxano poli-amino-funcional[8]) podem exigir o uso de cobaia (DIRETRIZ 406[5]). Outras limitações que foram identificadas para o LLNA[7] também foram recomendadas para se aplicar ao LLNA: BrdU-FCM[1]. Fora estas limitações identificadas, o LLNA: BrdU-FCM deve ser aplicável para testar quaisquer substâncias químicas de teste, a menos que existam propriedades associadas a estas substâncias que possam interferir com a precisão do LLNA: BrdU-ELISA. De acordo com o estudo de validação, o LLNA: BrdU-FCM identificou corretamente 20 das 22 substâncias de referência listadas no PS da DIRETRIZ 429 com base nos resultados do LLNA[1]. Um sensibilizante cutâneo moderado, 2-mercaptobenzotiazol, e um sensibilizador cutâneo fraco, metacrilato de metila, para o qual as outras variantes do LLNA têm limitação na predição, foram erroneamente classificados no LLNA: BrdU-FCM[1,2,9]. No entanto, como o mesmo conjunto de dados foi usado para definir os valores do Índice de Estimulação (SI) e calcular as propriedades preditivas do teste, os resultados declarados podem ser uma superestimação das propriedades preditivas reais.

4. Antes de usar a Diretriz de Teste em uma mistura para gerar dados para uma finalidade regulatória pretendida, deve-se considerar se (e, em caso afirmativo, o porquê) ela pode fornecer resultados adequados para essa finalidade. Tais considerações não são necessárias quando há exigência regulamentar para o teste da mistura.

5. Definições são fornecidas no anexo 1 da Introdução Geral.

PRINCÍPIO DO TESTE

6. O princípio básico subjacente ao LLNA: BrdU-FCM é que os sensibilizadores induzem a proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos de drenagem no local de aplicação do teste químico. Esta proliferação é proporcional à dose e à potência do alérgeno aplicado e proporciona um meio simples de obter a medição quantitativa da sensibilização. A multiplicação é medida comparando-se a proliferação média em cada grupo de teste com a proliferação média no grupo de controle tratado com veículo (VC). A razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e no grupo VC concomitante, denominada SI, é determinada e deve ser $\geq$2,7 antes que seja justificada uma avaliação adicional da substância química em estudo como um potencial sensibilizador cutâneo. Os métodos descritos aqui são baseados no uso da medição do conteúdo de BrdU para indicar o aumento no número de células em proliferação nos gânglios linfáticos auriculares drenantes. BrdU é um análogo da timidina e é similarmente incorporado ao DNA das células em proliferação. A incorporação de BrdU é medida por FCM, que utiliza um anticorpo específico para BrdU que também é marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). O FCM (citometria de fluxo) quantifica o número de células viáveis positivas para BrdU usando um citômetro de fluxo, que é amplamente empregado na análise da população de linfócitos.

DESCRIÇÃO DO ENSAIO

Seleção da espécie animal

7. O camundongo é a espécie de escolha para este teste. Estudos de validação para o LLNA: BrdU-FCM foram conduzidos exclusivamente com a raça BALB/c, que é, portanto, considerada a raça preferida[1,2]. A raça CBA/J também pode ser usada no LLNA: BrdU-FCM. As respostas da raça CBA/J são altamente correlacionadas e mais sensíveis do que as respostas da raça BALB/c[2,10-12]. No entanto, diferentes valores de corte de SI podem ter que ser adotados para cada raça para maximizar a sensibilidade após a análise ROC (Características Operacionais do Receptor). São utilizados camundongos fêmeas, adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre 8 e 12 semanas de idade e a variação de peso dos animais deve ser mínima e não exceder 20% do peso médio. Alternativamente, podem ser utilizadas outras raças ou machos quando são produzidos dados suficientes para demonstrar que não existem diferenças significativas na raça e/ou gênero na resposta LLNA: BrdU-FCM.

Condições de acomodação e alimentação

8. Os camundongos devem ser mantidos em grupo[13], em gaiolas de piso sólido[34], com substrato e material de nidificação adequados[35-38], a não ser que razão científica adequada para a alternativa de acomodação individual dos camundongos seja fornecida. A temperatura da sala experimental do animal deve ser 22 ± 3ºC. Embora a umidade relativa deva ser de, pelo menos, 30% e preferencialmente não exceder 70%, a não ser durante a limpeza do quarto, o objetivo deve ser manter entre 50 e 60%. A iluminação deve ser artificial, sendo a sequência de 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Para alimentação, as dietas convencionais de laboratório podem ser usadas, com suprimento ilimitado de água potável.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de forma indolor, para permitir a identificação individual, preferencialmente por grampos não invasivos[39,40], e mantidos em suas gaiolas por, pelo menos, 5 dias antes do início da dosagem para permitir a aclimatação às condições laboratoriais. Antes do início do tratamento, todos os animais são examinados, para garantir que não tenham lesões cutâneas observáveis. Durante todos os exames, os camundongos devem ser manipulados usando-se métodos não aversivos, como copos ou tubos de manipulação (cupping/ handlingtunnel)[41].

Preparação das soluções de dose

10. As substâncias químicas de teste sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes/veículos e diluídas, se apropriado, antes da aplicação a uma orelha do camundongo. As substâncias químicas de teste líquidas podem ser aplicadas puras ou diluídas antes da dosagem. Substâncias químicas insolúveis, como aquelas geralmente vistas em dispositivos médicos[33], devem ser submetidas à extração exaustiva em um solvente apropriado para revelar todos os constituintes extraíveis para teste antes da aplicação na uma orelha do camundongo. As substâncias químicas de teste devem ser preparadas diariamente, a menos que os dados de estabilidade demonstrem a aceitabilidade do armazenamento.

Verificação de confiabilidade

11. Os controles positivos (PC) são utilizados para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, respondendo com sensibilidade adequada e replicável à substância de teste de sensibilização, para a qual a magnitude da resposta é

bem caracterizada. Recomenda-se a inclusão de um PC simultâneo, pois demonstra a competência do laboratório para realizar com sucesso cada ensaio e permite uma avaliação da replicabilidade e da comparabilidade dentro e entre laboratório(s). Um PC para cada estudo também é exigido por algumas autoridades reguladoras e, portanto, os usuários são encorajados a consultar as autoridades relevantes antes de conduzir o LLNA: BrdU-FCM. Consequentemente, o uso rotineiro de um PC concorrente é encorajado, para evitar a necessidade de testes adicionais em animais para atender a tais requisitos que possam surgir do uso de um PC periódico (ver parágrafo 12). O PC deve produzir uma resposta positiva de LLNA: BrdU-FCM, no nível de exposição esperado, para aumentar o Índice de Estimulação(SI) >2,7 em relação ao grupo VC (controle de veículo). A dose de PC deve ser escolhida de modo a não causar irritação excessiva da pele ou toxicidade sistêmica, com indução replicável, mas não excessiva (ou seja, SI>27). As substâncias de ensaio para PC preferidas são o hexilcinamaldeído a 25% ("Chemical Abstracts Service [CAS]" nº 101-86-0) e 25% eugenol (n° CAS 97-53-0) em acetona: azeite (4:1, v/v). Talvez existam circunstâncias nas quais, dada justificativa adequada, outra substância química de teste PC seja usada, cumprindo-se os critérios acima.

12. Embora seja recomendada a inclusão de um grupo de PC concomitante, pode haver situações em que o teste periódico (a intervalos ≤6 meses) da substância de teste de PC possa ser adequado para laboratórios que conduzem regularmente o LLNA: BrdU-FCM (ou seja, conduzir o LLNA: BrdU-FCM com frequência não inferior a uma vez por mês) e ter uma base de dados de PC histórica estabelecida que demonstre a capacidade do laboratório de obter resultados reproduzíveis e precisos com os PC. A proficiência adequada com o LLNA: BrdU-FCM pode ser demonstrada com sucesso, gerando resultados positivos consistentes com o PC em, pelo menos, 10 testes independentes realizados dentro de período razoável (isto é, menos de um ano).

13. Um grupo de PC simultâneo deve sempre ser incluído quando houver mudança de procedimento no LLNA: BrdU-FCM (por exemplo, mudança no pessoal treinado, nos materiais do método de teste e/ou reagentes, no equipamento do método de teste, na origem dos animais de teste) e tais mudanças devem ser documentadas em relatórios do laboratório. Deve-se considerar o impacto dessas mudanças na adequação da base de dados históricos previamente estabe-

lecidos para determinar a necessidade de estabelecer um novo banco de dados histórico para documentar a consistência nos resultados do PC.

14. Os pesquisadores devem estar cientes de que a decisão de conduzir um estudo de PC periodicamente, em vez de simultaneamente, tem ramificações sobre a adequação e a aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos gerados sem um PC concorrente, durante o intervalo entre cada estudo de PC periódico. Por exemplo, se um resultado falso negativo for obtido no estudo em PC periódico, os resultados negativos da substância de teste obtidos no intervalo entre o último estudo periódico de PC aceitável e o estudo periódico em PC inaceitável podem ser questionados. Implicações desses resultados devem ser cuidadosamente consideradas ao determinar se devem incluir PC simultâneos ou apenas conduzir PC periódicos. Deve-se considerar também o uso de menos animais no grupo PC concomitante, quando isso for cientificamente justificado e quando o laboratório demonstrar, com base em dados históricos específicos, que menos camundongos podem ser usados[14].

15. Embora a substância química de teste do PC deva ser testada no veículo que é conhecido por provocar resposta consistente (por exemplo, acetona: azeite; 4:1, v/v), pode haver certas situações regulatórias nas quais também será necessário testar em veículo não padronizado (formulação clinicamente/quimicamente relevante)[15]. Se a substância química do PC simultâneo for testada em veículo diferente da substância de teste, deve ser incluído um grupo de controle tratado com veículo (VC) separado para o PC simultâneo.

16. Nos casos em que substâncias químicas de teste, de uma classe química específica ou faixa de respostas, estão sendo avaliadas, as substâncias de referência também podem ser úteis para demonstrar que o método de teste está funcionando adequadamente na detecção do potencial de sensibilização cutânea. As substâncias químicas de teste de referência apropriadas devem ter as seguintes propriedades:

- Semelhança estrutural e funcional à classe do químico teste a ser avaliado
- Características físico-químicas conhecidas
- Dados suportes do LLNA: BrdU-FCM
- Dados suportes de outros modelos animais e/ou de humanos

PROCEDIMENTO DE TESTE

Número de animais e níveis de dose

17. Utiliza-se o mínimo de 4 animais por grupo de dose, com o mínimo de 3 concentrações da substância química em estudo, mais um grupo VC simultâneo tratado apenas com o veículo para a substância química em estudo e um grupo PC (simultâneo ou recente, baseado na política laboratorial, em consideração aos parágrafos 11-15). O teste de doses múltiplas do PC deve ser considerado especialmente ao testar o PC de forma intermitente. Exceto pela ausência de tratamento com a substância química em teste, os animais nos grupos de controle devem ser manipulados e tratados de maneira idêntica à dos animais nos grupos de tratamento.

18. A seleção de dose e veículo deve basear-se nas recomendações dadas nas referências[2,19]. Três doses consecutivas são normalmente selecionadas de uma série de concentrações apropriadas, como 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, etc. Justificativa científica adequada deve acompanhar a seleção das séries de concentração usadas. Todas as informações toxicológicas existentes (por exemplo, toxicidade aguda e irritação dérmica) e estruturais e físico-químicas sobre a substância de teste de interesse (e/ou substâncias de teste estruturalmente relacionadas) devem ser consideradas, quando disponíveis, selecionando-se as 3 concentrações consecutivas para que a concentração mais alta maximize a exposição, evitando toxicidade sistêmica e/ ou irritação excessiva do local da pele[16,17]. Na ausência de tal informação, pode ser necessário um teste inicial pré-triagem (ver parágrafos 21-24).

19. O veículo não deve interferir ou influenciar o resultado do ensaio e deve ser selecionado com base na maximização da solubilidade, a fim de obter a concentração mais elevada possível, produzindo simultaneamente uma solução/ suspensão adequada para a aplicação da substância teste. Veículos recomendados são acetona: azeite (4:1, v/v), N,N-dimetilformamida, butanona (metiletilcetona), propilenoglicol e dimetilsulfóxido(6), mas outros podem ser usados se razões científicas suficientes forem fornecidas. Em certas situações, poderá ser necessário utilizar um solvente clinicamente relevante ou a formulação na qual a substância de teste é comercializada, como um controle adicional. Deve-se ter particular cuidado para assegurar que as substâncias hidrofílicas sejam incorporadas ao sistema de veículo, o qual molhe a pele e não escorra imediatamente, por incorporação de solubilizantes apropriados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1%). Assim, veículos totalmente aquosos devem ser evitados.

20. O processamento de gânglios linfáticos de camundongos individuais permite a avaliação da variabilidade interanimal e a comparação estatística da diferença entre a substância química de teste e as medições do grupo VC (ver parágrafo 33). Além disso, avaliar a possibilidade de reduzir o número de camundongos no grupo PC é factível quando dados individuais de animais são coletados[14]. Entretanto, algumas autoridades reguladoras nacionais exigem a coleta de dados individuais sobre animais. A coleta regular de dados de animais individuais proporciona vantagem em termos de bem-estar animal, evitando testes duplicados – que seriam necessários se os resultados da substância de teste originalmente recolhidos de uma maneira (por exemplo, dados de animais agrupados) fossem considerados posteriormente pelas autoridades reguladoras com outros requisitos (por exemplo, dados animais individuais).

Pré-triagem

21. Na ausência de informação para determinar a dose mais elevada a ser testada (ver parágrafo 18), deve ser realizada uma pré-triagem para definir o nível de dose apropriado ser testado no LLNA: BrdU-FCM. O objetivo da pré-triagem é fornecer orientações para a seleção do nível máximo de dose a ser utilizado no estudo LLNA: BrdU-FCM principal, se a informação sobre a concentração que induz toxicidade sistêmica (ver parágrafo 24) e/ou excessiva irritação local da pele (ver parágrafo 23) não estiver disponível. O nível máximo de dose testado deve ser de concentração de 100% da substância teste para líquidos ou a concentração máxima possível para sólidos ou suspensões.

22. A pré-triagem é realizada em condições idênticas às do estudo LLNA: BrdU-FCM principal, exceto que não há avaliação da proliferação de gânglios linfáticos e pode utilizar-se menos animais por grupo de dose. Um ou dois animais por grupo de dose são sugeridos. Todos os camundongos serão observados diariamente para quaisquer sinais clínicos de toxicidade sistêmica ou irritação no local da aplicação. Os pesos corporais são registrados antes do teste e antes do término (dia 6). Ambas as orelhas de cada camundongo são observadas para eritema e pontuadas, usando-se a tabela 1[17]. As medições da espessura da orelha são feitas usando-se um medidor de espessura (por exemplo, micrômetro digital ou medidor de espessura Peacock Dial) no Dia 1 (pré-dose), no Dia 3 (aproximadamente 48 horas após a primeira dose) e no Dia 6. Além disso, no dia 6, a espessura da orelha pode ser estabelecida por determinações do peso da punção, que devem ser realizadas após os animais serem eutanasiados. A

irritação local excessiva é indicada por um ponto de eritema ≥3 e/ou espessura de orelha ≥25% em qualquer dia de mensuração[18,19]. A dose mais elevada selecionada para o estudo principal LLNA: BrdU-ELISA será a próxima dose mais baixa na série de concentrações pré-triagem (ver parágrafo 18) que não induza toxicidade sistêmica e/ou excessiva irritação local da pele.

Tabela 1: Pontos de eritema

23. Além do aumento de 25% na espessura da orelha[18,19], o aumento estatisticamente significativo na espessura da orelha nos camundongos tratados, em comparação com camundongos controle, também foi usado para identificar irritações nos camundongos no LLNA[19-25]. No entanto, enquanto aumentos estatisticamente significativos podem ocorrer quando a espessura da orelha é inferior a 25%, eles não foram associados especificamente à irritação excessiva[22-26].

24. As seguintes observações clínicas podem indicar toxicidade sistêmica[27], quando usadas como parte de uma avaliação integrada e, portanto, podem indicar o nível máximo de dose a ser usado no LLNA: BrdU-FCM principal: mudanças na função do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações no comportamento (agressividade, mudança na atividade de limpeza, mudança marcada no nível de atividade); alterações nos padrões respiratórios (ou seja, alternações na frequência e na intensidade da respiração, tais como dispneia, respiração ofegante e estertores) e mudanças no consumo de alimentos e água. Sinais de letargia e/ou falta de responsividade e quaisquer sinais clínicos de dor ou angústia mais do que leve ou momentânea, ou redução > 5% no peso corporal do Dia 1 ao Dia 6, e mortalidade devem ser considerados na avaliação. Animais moribundos ou animais evidenciando dor ou mostrando sinais de sofrimento severo e duradouro devem ser eutanasiados[28].

Agenda experimental do estudo principal

35. Segue a agenda experimental do ensaio:

- Dia 1:

  Identificar e registrar individualmente o peso de cada animal e qualquer observação clínica. Aplicar 25μL da diluição apropriada da substância química em estudo, o veículo isolado ou o PC (simultâneo ou recente, com base na política de laboratório, em consideração aos parágrafos 11-15), no dorso de cada orelha.

- Dias 2 e 3:

Repetir o procedimento de aplicação começado no dia 1.

- Dia 4:

  Sem tratamento.

- Dia 5:

  Injetar 0,1mL (2mg/camundongo) de injeção intraperitoneal BrdU (20mg/mL).

- Dia 6:

  Registrar o peso de cada animal e qualquer observação clínica. Aproximadamente 24 horas após a injeção de BrdU, eutanasiar os animais. Extrair os gânglios linfáticos auriculares de drenagem de cada orelha do camundongo e processar separadamente em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para cada animal. Detalhes e diagramas de identificação e dissecação de gânglios podem ser encontrados na referência[17]. Para monitorar ainda mais a resposta local da pele no estudo principal, parâmetros adicionais, como pontuação do eritema da orelha ou medidas da espessura da orelha (obtidas por meio de um medidor de espessura ou determinação do peso da punção na necropsia), podem ser incluídos no protocolo do estudo.

Preparação das suspensões de célula

26. De cada camundongo, uma suspensão unicelular de células de gânglio linfático (LNC) excisada bilateralmente é preparada por desagregação mecânica suave, através de gaze de aço inoxidável de malha 200 micra ou outra técnica aceitável para gerar uma suspensão de célula única (por exemplo, utilização de almofariz de plástico para esmagar os gânglios linfáticos, seguido de passagem através de uma malha de nylon # 70). O procedimento para preparar a suspensão de LNC é crítico neste ensaio e, portanto, todo operador deve adquirir a habilidade com antecedência. Os gânglios linfáticos nos animais VC são pequenos, portanto, a operação cuidadosa é importante para evitar quaisquer efeitos artificiais nos valores de SI. As LNC são coletadas com volume apropriado de PBS frio (por exemplo, 2mL) e, se necessário, a suspensão de LNC pode ser diluída (diluição 1/10). O número de LNC deve ser contado e, em seguida, 1,5 $\times$ 106 LNC serão necessários para a próxima etapa.

Determinação de proliferação celular (medida de linfócitos BrdU-positivos)

27. Os linfócitos positivos para BrdU são contados através do FCM, utilizando um kit comercialmente disponível (por exemplo, no estudo de validação foi utilizado

o BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EUA). Outros kits de anticorpos anti-BrdU podem ser usados se eles fornecerem resultados consistentes. Resumidamente, a suspensão LNC (1,5 x 106) é lavada uma vez com PBS por centrifugação e então ressuspendida. As células são permeabilizadas com o tampão fornecido com o kit e depois tratadas com DNase. Após lavagem, adiciona-se o anticorpo anti-BrdU conjugado com FITC e, após outra lavagem, a solução de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) é adicionada. O número de células positivas para BrdU dentro da população celular que expressa 7-AAD viável (104 células) é contado com um citômetro de fluxo.

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Cada camundongo deve ser cuidadosamente observado, pelo menos uma vez por dia, para quaisquer sinais clínicos, quer de irritação no local da aplicação, quer de toxicidade sistêmica. Todas as observações são sistematicamente anotadas nos registros, sendo mantidos para cada animal. Os planos de monitoramento devem incluir critérios para identificar prontamente para a eutanásia aqueles camundongos que apresentarem toxicidade sistêmica, irritação excessiva da pele local ou corrosão da pele[28].

Peso corporal

29. Como indicado no parágrafo 25, os pesos individuais dos animais devem ser medidos no início do teste e na eutanásia programada.

CÁLCULO DE RESULTADOS

30. Os resultados para cada grupo de tratamento são expressos como o SI médio. O SI para o LLNA: BrdU-FCM é derivado da divisão do número de LNC/camundongos positivos para BrdU do grupo da substância química teste ou do grupo PC pelo número médio de LNC positivos para BrdU no grupo solvente/VC. O SI médio para os VC é então igual a 1.

O número de LNC positivos para BrdU é definido como (veja apêndice IB-Anexo 1 parágrafo 7): Número de LNC positivos para BrdU = % de células positivas para BrdU (% de Q21) x número de LNC.

(1) Os dados de porcentagem regional (gated) (% da região Q2) de "Estatísticas do Quadrante" na análise do citômetro de fluxo.

31. O processo de decisão considera um resultado positivo quando SI $\geq$2,7[1,2,10]. No entanto, a força da relação dose-resposta, a significância estatística e a consistência das respostas solvente/veículo e PC também podem ser usadas para determinar se um resultado limítrofe é declarado positivo[6,29,30].

32. Se for necessário esclarecer os resultados obtidos, deve-se considerar também várias propriedades da substância química em estudo, incluindo se ela tem relação estrutural com os sensibilizadores cutâneos conhecidos, se causa irritação excessiva da pele no camundongo e a natureza da dose-resposta observada. Essas e outras considerações são discutidas em detalhes em outros lugares[31].

33. A coleta de dados no nível individual permitirá a análise estatística da presença e do grau de relação dose-resposta nos dados dos animais. Qualquer avaliação estatística pode incluir uma avaliação da relação dose-resposta, bem como comparações adequadamente ajustadas de grupos de teste (por exemplo, grupo doseado por pares *versus* comparações de solvente controle). Análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressão linear ou teste de William para avaliar tendências dose-resposta e teste Dunnett para comparações de pares. Ao escolher um método apropriado de análise estatística, o investigador deve ter em mente possíveis desigualdades de variâncias e outros problemas relacionados, que podem exigir uma transformação de dados ou uma análise estatística não-paramétrica. Em qualquer caso, o investigador pode precisar realizar cálculos de SI e análises estatísticas com e sem certos pontos de dados (às vezes chamados de outliers ou aberrações estatísticas).

DADOS E RELATÓRIO

Dados

34. Dados devem ser resumidos em tabelas, mostrando o número de LNC positivos para cada animal, o número médio do grupo de LNC/animal positivo para BrdU ou o erro associado (como SD, SEM) e o SI médio para cada grupo de dose, comparado com o grupo de controle solvente/veículo simultâneo.

Relatório de teste

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

Substância química de teste

- Origem, número de lote, dados limite para uso, se disponíveis
- Estabilidade da substância química teste, se conhecida

Substância monoconstituinte

- Aparência física, solubilidade da água e propriedades físico-químicas adicionais relevantes
- Identificação química, como nome IUPAC ou CAS, número CAS, SMILES ou código InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, quando apropriado e viável, etc.

Substância multiconstituinte, UVBC e misturas

- Caracterizado, na medida do possível, por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes

Controles

- Dados de identificação (como número CAS, se possível; origem; pureza; impurezas conhecidas; número do lote)
- Natureza física e propriedades físico-químicas (como volatilidade, estabilidade e solubilidade)

Solvente/veículo

- Dados de identificação (pureza; concentração, quando apropriado; volume usado)
- Justificativa de escolha do veículo

Animais de teste

- Origem dos camundongos BALB/c ou CBA
- Estado microbiológico dos animais, quando conhecido
- Número e idade dos animais
- Origem dos animais, condições de acomodação, dieta, etc.

Condições de teste

- Origem, número de lote e dados do controle/garantia de qualidade do fabricante (sensibilidade e especificidade do anticorpo e o limite de detecção) para o kit ELISA

- Detalhes da preparação e aplicação da substância química de teste
- Justificativa para a seleção da dose (incluindo resultados do teste pré-triagem, se conduzido)
- Concentrações do veículo e da substância teste usadas e quantidade total da substância teste aplicada
- Detalhes da qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo/origem de dieta, fonte de água)
- Detalhes do tratamento e da agenda de amostragem
- Métodos para a medida de toxicidade
- Critérios para considerar o estudo como positivo ou negativo
- Detalhes de qualquer desvio de protocolo e uma explicação de como o desvio afeta o desenho do estudo e os resultados

Verificação de confiabilidade

- Um resumo dos resultados da verificação de confiabilidade mais recente, incluindo informações sobre substância química em teste, concentração, PC, VC e substância química teste de referência usada, conforme apropriado
- PC simultâneo ou histórico e dados do VC simultâneo para laboratório de teste
- Se um PC simultâneo não for incluído, deve-se fornecer a data e o relatório do laboratório para o PC periódico mais recente e um relatório detalhando dados do PC histórico para o laboratório, justificando a base para não conduzirem um PC simultâneo

Resultados

- Pesos individuais dos camundongos no início da dosagem e na eutanásia programada; bem como o erro médio associado (por exemplo, SD, SEM) para cada grupo de tratamento
- Período de aparecimento e dos sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da administração, se houver, para cada animal
- Uma tabela do número de LNC positivos para BrdU e valores SI de cada camundongo para cada grupo de tratamento
- Termo de erro médio e associado (como SD, SEM) para número de LNC/camundongos positivos para BrdU para cada grupo de tratamento e os resultados de análise de “outlier” para cada grupo de tratamento

- SI calculado e uma medida apropriada de variabilidade que leve em conta a variabilidade interanimal na substância química teste e nos grupos de controle
- Relação dose-resposta
- Análises estatísticas, quando apropriado

Discussão dos resultados:

- Um breve comentário sobre os resultados, a análise dose-resposta e as análises estatísticas, quando apropriado, com uma conclusão sobre se a substância química em teste deve ser considerada um sensibilizante da pele

LITERATURA

(1) OECD (2018), Local Lymph Node Assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method (LLNA: BrdU-FCM) Validation Study Report, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 283, ENV/JM/MONO(2018)43, OECD, Paris.

(2) OECD (2018), Summary of the Peer Review of the Validation Study for LLNA: BrdU-FCM Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 284, ENV/JM/MONO(2018)44, OECD, Paris.

(3) Yang H, Na J, Jang WH, Jung MS, Jeon JY, Heo Y, Yeo KW, Jo JH, Lim KM, Bae SJ. (2015), Appraisal of within- and between-laboratory reproducibility of nonradioisotopic local lymph node assay using flow cytometry, LLNA: BrdU-FCM: Comparison of OECD DIRETRIZ429 performance standard and statistical evaluation. Toxicology Letters 234: 172-179.

(4) Ahn IY, Kim TS, Jung ES, Yi JS, Jang WH, Jung KM, Park MY, Jung MS, Jeon EY, Yeo KY, Jo JH, Park JE, Kim CY, Park YC, Seong WK, Lee AY, Chun YJ, Jeong TC, Jeung EB, Lim KM, Bae SJ, Sohn SJ, Heo Y. (2016), Performance standards based validation study for Local Lymph Node Assay: 5-Bromo-2-Deoxyuridine-flow cytometry method. Regul. Toxicol. Pharmacol. 80:183-194.

(5) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds:

The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

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

(9) Kolle SN, Basketter DA, Casati S, Stokes WS, Strickland J, Ravenzwaay BV, Vohr HW, Landsiedel R 2013. Performance standards and alternative assays: Practical insights from skin sensitization. Regulatory Toxicology and Pharmacology 65: 278-285.

(10) Lee YS, Yi JS, Seo SJ, Kim JH, Jung MS, Seo IK, Ahn IY, Ko KY, Kim TS, Lim KM, Sohn SJ. (2017), Comparison of BALB/c and CBA/J mice for the local lymph node assay using bromodeoxyuridine with flow cytometry (LLNA: BrdU-FCM). Regul. Toxicol. Pharmacol. 33:13-22.

(11) Ha SJ, Ahn IY, Kim DE, Lee JK, Sohn SJ, Jung MS, Heo Y, Omori T, Bae SJ, Lim KM. (2017) Evaluation of radioisotopic and non-radioisotopic versions of local lymph node assays for subcategorization of skin sensitizers compliant to UN GHS rev 4. Regul. Toxicol. Pharmacol. 85:124-131.

(12) Maeda, Y., Hirosaki, H., Yakata, N., Takeyoshi, M. (2016), Comparison of outcomes obtained in murine local lymph node assays using CBA/J or CBA/Ca mice. J. Appl. Toxicol. 36:1011-4.

(13) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(14) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://ic-

cvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

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

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

(17) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

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

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

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

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

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

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

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

(25) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sen-

sitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

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

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

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

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

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

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

(32) Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, et al. 2004. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. Contact Dermatitis 50:274-288.

(33) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.

(34) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C.

(35) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. Lab Animals 2002;36:243-270.

(36) Van Loo PLP, Kruitwagenb CLJJ, Koolhaasc JM, Van de Weerdd HA, Van

Zutphena LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. Applied Animal Behaviour Science. 2002;76(1):65-81.

(37) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. Trends in Neuroscience. 2001;24:207-211.

(38) Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs. Published January 2007. https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichm entandsystematicrandomization.pdf. Accessed April 06, 2018.

(39) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangenberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. Laboratory Animals. 2013;47:2-11.

(40) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf. Published 2008. Accessed April 9, 2018.

(41) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. Nature Methods. 2010;7:825-826.

APÊNDICE IB

ANEXO 1: medida de LNC positivos para BRDU com citometria de fluxo

Este método é baseado no protocolo LLNA: BrdU-FCM, usado para o estudo de validação coordenado pelo KoCVAM[1]. Recomenda-se que este protocolo seja utilizado na implementação e na utilização do LLNA: BrdU-FCM no laboratório.

Preparação antes da medição

1. Para medir BrdU incorporado, as seguintes amostras devem ser preparadas antes da medição:

- Amostra branca (n=1): LNC do camundongo não injetado com o BrdU
- Amostra de não tratamento (n=1): LNC do camundongo não tratado com nenhuma substância, mas que recebeu injeção de BrdU
- Amostra de tratamento de controle de veículo (n≥4): LNC do camundon-

go tratado com o controle de veículo e que recebeu uma injeção BrdU

- Amostra de tratamento do químico teste (n≥4, um mínimo de 3 concentrações): LNC do camundongo tratado com a substância química de teste e que recebeu injeção BrdU
- Amostra de tratamento de Controle Positivo (n≥4): LNC do camundongo tratado com o controle positivo e que recebeu uma injeção BrdU

Análise dos resultados de citometria de fluxo

2. Um citômetro de fluxo deve ser calibrado usando-se ferramentas apropriadas (por exemplo, "BD FACSComp", para FACSCaliburTM, ou "Beckman coulter FlowCheck", para Cytomics FC500) antes do teste ou regularmente.

Gráfico de dispersão de frente-dispersão de lado (FSC-SSC, "Forwardscatter-sidescatter")

1) Ambos eixos, X (FSC) e Y (SSC), devem estar em escala linear.
2) Configurar uma zona (região) com alguns gânglios linfáticos viáveis no centro no gráfico FSC-SSC.
3) Delinear a região de tal forma que ele tenha, pelo menos, 10.000 células.

Gráfico 7-AAD-BrdU

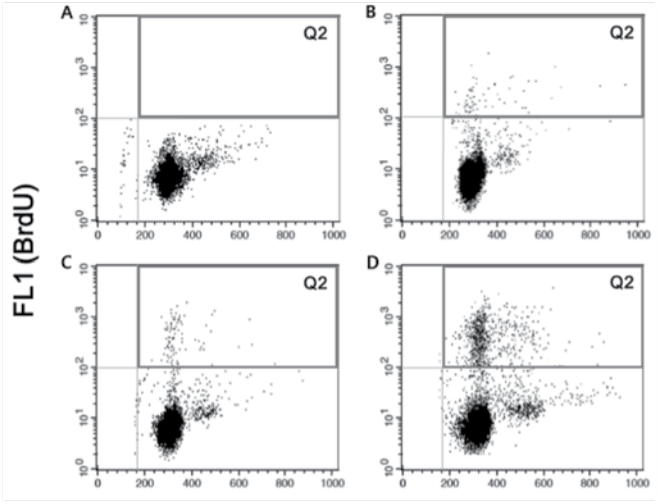
1) O eixo X (7-AAD, FL3) deve estar em escala linear, enquanto que o Y (BrdU, FL1) deve estar em escala de log (figura 1).

** A compensação deve ser feita usando amostras não coradas, somente coradas com BrdU, somente com amostras 7-AAD e duplamente coradas com ambos anti-BrdU e 7-AAD, no momento do início deste ensaio. A compensação pode ser salva para uso futuro.*

Configurar o Q2 seguindo os passos abaixo:

1) Usando a amostra branca, configurar o Q2 (superior, esquerda) onde nenhuma célula esteja presente (Figura 1A).
2) Usando uma amostra não tratada, configurar o Q2 para que % células positivas para BrdU sejam aproximadamente 1% de todas células (Figura 1B).
3) A percentagem da região Q2 indica a proporção de linfócitos vivos positivos conjugados a anticorpos-BrdU FITC em 10.000 LNC.

Figura 1. Configuração de citometria de fluxo para cálculo de % de células positivas para BrdU (% de Q2)



Nota: A - amostra branca; B - amostra não tratada; C - amostra de tratamento de controle de veículo; D - amostra de tratamento de controle positivo ou de químico teste.

Contagem de % células positivas para BrdU

3. Realizar a operação de citometria de fluxo para as amostras de tratamento de controle do veículo (Figura 1C), as amostras de tratamento químico de teste e as amostras de tratamento de controle positivo (Figura 1D). Obter os dados de porcentagem fechada (% da região Q2) de "Estatísticas de quadrantes" para cada amostra.

Cálculo do SI e do EC2,7

4. O número de LNC positivas para BrdU nas LN do grupo controle de tratamento de veículo é obtido multiplicando o número de LNC nos LN pela taxa de células expressando BrdU nas 10.000 LNC (obtido por citometria de fluxo). O número de LNC positivas para BrdU nos LN do grupo de tratamento com a substância química em teste é obtido pelo método descrito acima.

Os SI individuais são calculados dividindo-se o número de LNC positivas para BrdU/camundongos no grupo de tratamento com químico teste pelo número mé-

dio de LNC positivas para BrdU no grupo de tratamento com controle de veículo. O SI médio de cada grupo de químico teste é calculado baseado nos SI individuais.

$$\textit{Índice de Estimulação (SI)} = \frac{\textit{Númerdo de LNCs BrdU positivos/ camundongos expostos à substância química de teste}}{\text{Número médio de LNCs BrdU-positivos no grupo de controle de veículo}}$$

5. Para resultados positivos, o valor do EC2,7, isto é, uma concentração estimada mostrando 2,7 de SI, pode ser calculado por método de regressão linear usando-se a seguinte equação.

$$Y\,(SI) = aX(\text{concentração}) + b \longrightarrow EC2.7 = (2.7 - b)/\,a$$

** Parâmetros a (inclinação) e b (intercept-y) podem ser derivados, usando-se o método dos mínimos quadrados lineares.*

Outros métodos de estimativas (como interpolação linear ou fórmulas de extrapolação) podem ser utilizados para calcular o valor EC2,7[32].

Adotado: 4 de Fevereiro de 2015

Guia da OECD para o ensaio de substâncias químicas - 442C

Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade do peptídeo (DPRA)

INTRODUÇÃO

1. Um sensibilizante cutâneo é uma substância que levará a uma resposta alérgica após contato com a pele, conforme definido pelo Sistema Global Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (UN GHS)[(1)]. Esta diretriz fornece um procedimento químico (Ensaio de Reatividade Direta – DPRA, em inglês) a ser utilizado, para apoiar a discriminação entre sensibilizadores cutâneos e não sensibilizadores, de acordo com o GHS da ONU[(1)].

2. Existe consenso sobre os principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. O conhecimento existente, dos mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea, foi resumido e pode ser encontrado na Via de Resultado Adverso (VRA)[(2)], a partir do evento de iniciação molecular, através dos eventos intermediários para o efeito adverso, ou seja, dermatite alérgica de contato em humanos ou hipersensibilidade de contato em roedores. Dentro da VRA de sensibilização cutânea, o evento de iniciação molecular é a ligação covalente de substâncias eletrofílicas a centros nucleofílicos em proteínas.

3. A avaliação da sensibilização cutânea tradicionalmente envolve o uso de animais de laboratório. Os métodos clássicos baseados em cobaias, o Teste de Maximização de Cobaias Magnusson Kligman (GMPT) e o Teste de Buehler – Diretriz 406[(3)], estudam as fases de indução e eliciação da sensibilização. Um teste com camundongos, o Ensaio de Linfonodo Local (LLNA), Diretriz 429[(4)], e suas duas modificações não radioativas (LLNA: DA, Diretriz 442 A[(5)], e LLNA: BrdU-ELISA, Diretriz 442 B[(6)], que avaliam resposta de indução exclusivamente) também ganharam aceitação, uma vez que proporcionam uma vantagem sobre os testes com cobaias, em termos de bem-estar animal, e uma medida objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.

4. Mais recentemente, métodos de teste, baseados unicamente em explicações físicas ou biológicas*, como teste *in chemico* e *in vitro*, foram considerados cien-

tificamente válidos para a avaliação do risco de sensibilização cutânea a substâncias químicas. No entanto, combinações de métodos não animais (*in silico*, *in vitro*, *in vitro*) contidas nas Abordagens Integradas para Testes e Avaliação (AITA) serão necessárias para se poder substituir totalmente os testes em animais atualmente em uso, dada a cobertura mecanicista restrita de VRA – dos métodos de teste não animais disponíveis nos dias de hoje[2;7].

5. O DPRA é proposto para abordar o evento de iniciação molecular da VRA da sensibilização cutânea; ou seja, reatividade proteica, medindo a reatividade de substâncias químicas em teste, com respeito a peptídeos sintéticos modelo, contendo lisina ou cisteína[8]. Os valores percentuais de depleção dos peptídeos cisteína e lisina são usados para categorizar uma substância em uma das quatro classes de reatividade, para apoiar a discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores cutâneos[9].

6. O DPRA foi avaliado num laboratório de referência da União Europeia para alternativas ao teste em animais (EURL ECVAM) - estudo de validação direto e subsequente revisão, independente pelo Comitê Científico Consultivo do CEVAM do EURL (ESAC), sendo considerado cientificamente válido[10] para ser utilizado como parte de um AITA para apoiar a discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores cutâneos, para fins de classificação e rotulagem de risco. Exemplos sobre o uso de dados de DPRA em combinação com outras informações são relatados na literatura[11-14].

7. As definições são fornecidas no anexo I.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

8. A correlação da reatividade proteica com o potencial de sensibilização cutânea está bem estabelecida[15-17]. Apesar disso, uma vez que a ligação proteica representa apenas um evento-chave, embora seja o evento de iniciação molecular da VRA de sensibilização cutânea, a informação de reatividade proteica, gerada com métodos de teste e não teste, pode não ser suficiente para se concluir sobre a ausência de potencial de sensibilização cutânea de uma substância química. Portanto, os dados gerados com esta diretriz devem ser considerados no contexto de abordagens integradas, tal como o AITA, combinando-os com outras infor-

mações complementares, por exemplo, derivadas de ensaios *in vitro*, abordando outros eventos importantes da VRA de sensibilização cutânea, bem como métodos de não testes, incluindo métodos de leitura comparativos de substâncias químicas análogas.

9. O método de teste descrito nesta diretriz pode ser usado, em combinação com outras informações complementares, para apoiar a discriminação entre sensibilizadores cutâneos (ou seja, UN GHS Categoria 1) e não sensibilizadores no contexto da AITA. Esta diretriz não pode ser usada sozinha, nem para subcategorizar os sensibilizadores cutâneos nas subcategorias 1A e 1B definidas pelo GHS [(1)], tampouco para autoridades implementarem essas duas subcategorias opcionais, nem para prever a probabilidade nas tomadas de decisões da avaliação de segurança. No entanto, dependendo do quadro regulatório, um resultado positivo com o DPRA pode ser usado sozinho para classificar uma substância química na categoria 1 do GHS.

10. O método de teste DPRA provou ser transferível para laboratórios com experiência em análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, em inglês). O nível de reprodutibilidade nas previsões que podem ser esperadas do método de teste é da ordem de 85%, dentro dos laboratórios, e 80%, entre os laboratórios[(10)]. Os resultados gerados no estudo de validação[(18)] e nos estudos publicados[(19)], em geral, indicam que a precisão do DPRA em discriminar sensibilizadores (isto é, UN GHS Cat. 1) de não sensibilizadores é de 80% (N=157), com sensibilidade de 80% (88/109) e especificidade de 77% (37/48), quando comparados aos resultados do LLNA. É mais provável que o DPRA subestime substâncias químicas que apresentem potência de sensibilização cutânea – baixa a moderada (isto é, subcategoria UN GHS 1B) do que substâncias químicas com elevada potência de sensibilização cutânea (isto é, subcategoria 1A do GHS)[(18-19)]. No entanto, os valores de precisão fornecidos aqui, para o DPRA como um método de teste independente, são apenas indicativos, pois o método de teste deve ser considerado em combinação com outras fontes de informação, no contexto de um AITA, e de acordo com as disposições do parágrafo 9 acima. Além disso, quando se avaliam métodos livres de animais para a sensibilização cutânea, deve-se ter em mente que o teste LLNA, bem como outros testes em animais, podem não refletir totalmente a situação nas espécies de interesse, ou seja, os seres humanos. Com base nos dados globais disponíveis, o DPRA demonstrou ser aplicável a

substâncias químicas em teste abrangendo uma variedade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potência de sensibilização cutânea (conforme determinado em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas[8-10;19]. Tomadas em conjunto, estas informações indicam a utilidade do DPRA para contribuir na identificação do risco de sensibilização.

11. O termo "substância química em teste" é utilizado nesta diretriz para se referir ao que está sendo testado[1] e não está relacionado à aplicabilidade do DPRA ao teste de substâncias e/ou misturas. Esta diretriz não se aplica ao ensaio de compostos metálicos, uma vez que se sabe que eles reagem com proteínas e outros mecanismos que não a ligação covalente. Uma substância química em teste deve ser solúvel em um solvente apropriado na concentração final de 100mM (ver parágrafo 18). No entanto, as substâncias químicas em teste, que não sejam solúveis nessa concentração, ainda podem ser testadas em concentrações solúveis mais baixas. Nesse caso, um resultado positivo ainda pode ser usado para apoiar a identificação da substância química em teste como um sensibilizador cutâneo, mas nenhuma conclusão mais exata sobre a falta de reatividade deve ser tirada de um resultado negativo. Informações limitadas estão atualmente disponíveis sobre a aplicabilidade do DPRA a misturas de composição conhecida[18-19]. O DPRA é, no entanto, considerado tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias multiconstituintes e misturas de composição conhecida (ver parágrafo 18). Antes de usar esta diretriz em uma mistura para gerar dados para uma finalidade regulatória pretendida, deve-se considerar se e por que ela pode fornecer resultados adequados para este fim. Tais considerações não são necessárias quando existe um requisito regulamentar para o teste da mistura. O modelo de previsão atual não pode ser utilizado para misturas complexas de composição desconhecida ou para substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos (isto é, substâncias UVCB), devido à razão molar definida de substância química e peptídeo de teste. Para este propósito, um novo modelo de previsão, baseado em uma abordagem gravimétrica, precisará ser desenvolvido. Nos casos em que as provas possam ser demonstradas relativamente a não aplicabilidade da diretriz a outras categorias específicas de substâncias químicas, o método de ensaio não deve ser utilizado para as categorias específicas de substâncias químicas.

[1] Em junho de 2013, a Reunião Conjunta concordou que, sempre que possível, o uso mais consistente do termo "substância química em teste", descrevendo o que está sendo testado agora, deve ser aplicado em novas e atualizadas diretrizes de teste.

12. O método de teste descrito nesta diretriz é um método químico que não engloba um sistema metabólico. As substâncias químicas que requerem bioativação enzimática para exercer o seu potencial de sensibilização cutânea (pró-haptenos) não podem ser detectadas pelo teste. As substâncias químicas que se tornam sensibilizadoras após a transformação abiótica (pré-haptenos) são relatadas como sendo, em alguns casos, corretamente detectadas pelo método de teste[18]. À luz do acima exposto, os resultados negativos obtidos com o método de teste devem ser interpretados no contexto das limitações declaradas e na conexão com outras fontes de informação dentro da estrutura de um AITA. Testes químicos que não se ligam covalentemente ao peptídeo, mas promovem sua oxidação (isto é, dimerização de cisteína), podem levar à maior probabilidade da depleção de peptídeos, resultando em possíveis previsões falso positivas e/ou designação a uma classe de reatividade mais alta (ver parágrafos 29 e 30).

13. Como descrito, o ensaio DPRA dá suporte para a discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores cutâneos. No entanto, também pode contribuir excessivamente para a avaliação da potência de sensibilização[11], quando usado em abordagens integradas como a AITA. Contudo, mais trabalhos, preferencialmente baseados em dados humanos, são necessários para determinar como os resultados do DPRA podem possivelmente informar a avaliação da potência.

PRINCÍPIO DO TESTE

14. O DPRA é um método químico que quantifica a concentração restante de peptídeos contendo cisteína ou lisina, após 24 horas de incubação com a substância química em teste, a 25 ± 2,5ºC. Os peptídeos sintéticos contêm fenilalanina para auxiliar na detecção. A concentração relativa de peptídeos é medida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, em inglês) com eluição por gradiente e detecção por UV a 220nm. Os valores de depleção, em percentagem, dos peptídeos cisteína e lisina são calculados e utilizados num modelo de previsão (ver parágrafo 29), que permite associar a substância química em teste a uma das quatro classes de reatividade, utilizadas para suportar a discriminação entre sensibilizadoras e não sensibilizadoras.

15. Antes do uso rotineiro do método descrito nesta diretriz, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, usando as dez substâncias de proficiência listadas no anexo 2.

PROCEDIMENTO

16. Essa diretriz baseia-se no protocolo DPRA-ALM nº 154[20], que representa o protocolo usado para o estudo de validação coordenado pelo ECLON do EURL. Recomenda-se que este protocolo seja utilizado na implementação e no uso do método no laboratório. A seguir, apresentamos uma descrição dos principais componentes e procedimentos para o DPRA. Se uma configuração alternativa de HPLC for utilizada, sua equivalência com a configuração, validada e descrita no protocolo DB-ALM, deve ser demonstrada (testando as substâncias de proficiência no anexo 2).

Preparação dos peptídeos contendo cisteína ou lisina

17. Soluções de estoque de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) e lisina (Ac-RFAAKAA-COOH), contendo peptídeos sintéticos de pureza superiores a 85% e, preferencialmente na faixa de 90-95%, devem ser preparadas imediatamente antes de sua incubação com a substância química em teste. A concentração final do peptídeo de cisteína deve ser 0,667mM em fosfato pH 7,5 tamponado, enquanto que a concentração final do peptídeo lisina deve ser de 0,667mM em acetato de amônio a pH 10,2 tamponado. A sequência de execução da HPLC deve ser ajustada para manter o tempo de análise da HPLC em menos de 30 horas. Para a configuração de HPLC usada no estudo de validação e descrita nesta diretriz, até 26 amostras podem ser acomodadas em uma única operação de HPLC (amostras que incluem a substância química em teste, o controle positivo e o número apropriado de controles de solvente, com base no número de solventes usados no teste, cada um testado em triplicata). Todas as réplicas analisadas na mesma execução devem usar soluções de estoque de peptídeos de cisteína e lisina idênticas. Recomenda-se analisar os lotes de peptídeos individuais para solubilidade adequada antes de seu uso.

Preparação da substância química em estudo

18. A solubilidade da substância química em teste em um solvente apropriado deve ser avaliada antes de se realizar o ensaio, seguindo o procedimento de solubilização, descrito no protocolo DPRA DB-ALM[20]. Um solvente apropriado dissolverá completamente a substância química em teste. Como no DPRA, a substância química em teste é incubada em grande abundância com os peptídeos de cisteína ou lisina; a inspeção visual da formação de uma solução transparente

é considerada suficiente para determinar se ocorreu a dissolução do produto (e de todos os seus componentes, no caso de teste de uma substância multiconstituinte ou uma mistura). Os solventes adequados são: acetonitrilo, água, mistura 1: 1 água: acetonitrilo, isopropanol, acetona ou mistura 1: 1 acetona: acetonitrilo. Outros solventes podem ser utilizados, desde que não tenham impacto na estabilidade do peptídeo, sendo monitorizados com controles de referência C (isto é, amostras constituídas apenas pelo peptídeo dissolvido em solvente apropriado – ver anexo 3). Como última opção, se a substância química em estudo não for solúvel em qualquer um destes solventes, devem ser feitas tentativas para solubilizar em 300μL de DMSO e diluir a solução resultante com 2.700μL de acetonitrilo; se, mesmo assim, a substância química em teste não for solúvel nesta mistura, deve-se tentar solubilizar a mesma quantidade de substância química em 1.500μL de DMSO e diluir a solução resultante com 1.500μL de acetonitrilo. A substância química em teste deve ser pré-pesada em frascos de vidro e dissolvida imediatamente antes do teste, em um solvente apropriado para preparar uma solução de 100mM. Para misturas e substâncias multicomponentes de composição conhecida, deve-se determinar uma pureza única, pela soma da proporção dos seus constituintes (excluindo a água), e determinar se o peso molecular aparente único, considerando os pesos moleculares individuais de cada componente da mistura (excluindo a água) e suas proporções individuais. A pureza resultante e o peso molecular aparente devem então ser usados para calcular o peso da substância química em teste, necessário para preparar uma solução 100mM. Polímeros para os quais não se possa determinar peso molecular predominante, pode ser considerado o peso molecular do monômero (ou o peso molecular aparente dos vários monômeros que constituem o polímero) para se preparar uma solução 100mM. No entanto, ao testar misturas, substâncias multiconstituintes ou polímeros de composição conhecida, deve-se considerar, também, testar a substância química pura. Para líquidos, a substância química em teste pura deve ser isolada sem qualquer diluição prévia, incubando-a a 1:10 e 1:50, com cisteína e lisinopeptídeos, respectivamente. Para sólidos, a substância química em teste deve ser dissolvida até sua concentração máxima de solução, no mesmo solvente usado para preparar a solução aparente de 100mM. Deve ser testada sem qualquer diluição adicional, incubando-a à razão de 1:10 e 1:50, com cisteína e lisinopeptídeos, respectivamente. Resultados concordantes (reativos ou não reativos) entre a solução aparente de 100mM e o químico puro devem permitir uma conclusão segura sobre o resultado.

Preparação do controle positivo, controles de referência e controles de coeluição

19. O aldeído cinâmico (CAS 104-55-2; $\geq$95% de pureza alimentar) deve ser usado como controle positivo (CP), na concentração de 100mM em acetonitrilo. Outros controles positivos adequados, preferencialmente valores médios de depleção, podem ser usados, se dados históricos estiverem disponíveis para derivar os critérios de aceitação da execução. Adicionalmente, controles de referência (amostras contendo apenas o peptídeo dissolvido em solvente apropriado), também devem ser incluídos na sequência de execução da HPLC. Estes são usados para verificar a adequação do sistema HPLC antes da realização da análise (controles de referência A), a estabilidade dos controles de referência ao longo do tempo (controle de referência B) e para verificar se o solvente utilizado para dissolver a substância química em teste não impacta a porcentagem de depleção do peptídeo (controle de referência C) (ver anexo 3). O controle de referência apropriado para cada substância é utilizado para calcular a percentagem de depleção de peptídeos da mesma (ver parágrafo 26). Além disso, um controle de coeluição, constituído pela própria substância química de ensaio, de cada um dos produtos analisados, deve ser incluído na sequência de execução, para detectar a possível coeluição da substância com o peptídeo da lisina ou da cisteína.

Incubação da substância química em estudo com as soluções peptídicas de cisteína e lisina

20. As soluções de peptídeo de cisteína e lisina devem ser incubadas em frascos de vidro com amostrador automático, com a substância química na proporção de 1:10 e 1:50, respectivamente. Se um precipitado for observado imediatamente após a adição da solução química peptídica, devido à baixa solubilidade aquosa da substância química em teste, não se pode ter certeza da quantidade de substância química que permaneceu na solução para reagir com o peptídeo. Portanto, em tal caso, um resultado positivo ainda pode ser usado, mas um resultado negativo é incerto e deve ser interpretado com o devido cuidado (ver as anotações do parágrafo 11 para o teste de substâncias químicas não solúveis em uma concentração de 100mM). A solução reacional deve ser deixada no escuro a 25 $\pm$ 2,5^{o}C durante 24$\pm$2 horas antes de se executar a análise por HPLC. Cada substância química em teste deve ser analisada em triplicata para ambos os peptídeos. As amostras devem ser inspecionadas visualmente antes da análise por HPLC. Se um precipitado ou uma separação de fases for observado, as

amostras podem ser centrifugadas à baixa velocidade (100-400xg) para forçar a precipitação para o fundo do frasco, como precaução, uma vez que grandes quantidades de precipitado podem entupir a tubagem ou as colunas de HPLC. Se uma precipitação ou uma separação de fases é observada após o período de incubação, a depleção do peptídeo pode ser subestimada e uma conclusão sobre a falta de reatividade não pode ser feita com confiança suficiente, em caso de um resultado negativo.

Preparação da curva de calibração padrão da HPLC

21. Uma curva de calibração padrão deve ser gerada para os peptídeos de cisteína e lisina. Os padrões de peptídeos devem ser preparados em uma solução de 20% ou 25% de acetonitrila tamponada usando-se fosfato (pH 7,5), tamponado para o peptídeo de cisteína, e t acetato de amônia (pH 10,2), tamponado para o peptídeo de lisina. Para utilizar padrões de diluição em série da solução estoque de peptídeos (0,667mM), devem ser preparadas 6 soluções para cobrir a gama de 0,534 a 0,0167mM. Um vazio de diluição tamponado deve também ser incluído na curva de calibração padrão. Curvas de calibração adequadas devem ter um r^2>0,99.

Preparação e análise por HPLC

22. A adequação do sistema de HPLC deve ser verificada antes de se conduzir a análise. A depleção do peptídeo é monitorada por HPLC acoplada a um detector UV (detector de arranjo de fotodiodo ou detector de absorvância de comprimento de onda com sinal de 220nm). A coluna apropriada é instalada no sistema HPLC. A configuração de HPLC, descrita no protocolo validado, usa Zorbax SB-C-18 de 2,1mm x 100mm x 3,5micron como coluna preferida. Com esta coluna de HPLC de fase reversa, o sistema inteiro deve ser equilibrado a 30°C com 50% de fase A (0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético em água) e 50% de fase B (0,085% (v/v) de ácido trifluoroacético em acetonitrilo), durante, pelo menos, 2 horas antes da execução. A análise deve ser feita usando-se uma taxa de fluxo de 0,35mL/min e um gradiente linear de acetonitrilo a 10% a 25%, por mais de 10 minutos, seguido por aumento rápido para 90% de acetonitrilo para remover outros materiais. Volumes iguais de cada padrão, amostra e controle devem ser injetados. A coluna deve ser reequilibrada sob condições iniciais durante 7 minutos entre as injeções. Se uma coluna de HPLC de fase reversa diferente for utilizada, os parâmetros de configuração descritos acima podem precisar ser ajustados para garantir uma eluição apropriada e a integração dos peptídeos de cisteína e lisina, incluindo o volume

de injeção, que pode variar de acordo com o sistema usado (tipicamente na faixa de 3-10μL). É importante ressaltar que, se uma configuração alternativa de HPLC for usada, sua equivalência com a configuração validada, descrita acima, deve ser demonstrada (por exemplo, testando-se as substâncias de proficiência no anexo 2). A absorvância é monitorizada a 220nm. Se um detector de fotodiodo for usado, a absorbância a 258nm também deve ser registrada. Deve-se notar que alguns fornecimentos de acetonitrilo podem ter impacto negativo na estabilidade do peptídeo e deve ser avaliado quando é utilizado um novo lote de acetonitrilo. A relação entre a área do pico 220 e a área do pico 258 pode ser usada como um indicador de coeluição. Para cada amostra, uma razão no intervalo de 90%< taxa de área média das amostras de controle <100% daria uma boa indicação de que a coeluição não ocorreu.

23. Pode haver substâncias químicas em teste que promovem a oxidação do peptídeo de cisteína. O pico do peptídeo de cisteína dimerizada pode ser monitorado visualmente. Se a dimerização parecer ter ocorrido, isso deve ser anotado, pois a depleção percentual do peptídeo pode ser superestimada, levando a previsões falsamente positivas e/ou a uma classe de reatividade mais alta (ver parágrafos 29 e 30).

24. A análise por HPLC para os peptídeos de cisteína e lisina pode ser realizada simultaneamente (se estiverem presentes dois sistemas de HPLC) ou em dias separados. Se a análise for conduzida em dias separados, todas as soluções químicas em teste devem ser preparadas na hora, para ambos os ensaios, em cada dia. A análise deve ser cronometrada, para assegurar que a injeção da primeira amostra comece 22 a 26 horas após a mistura química em teste com a solução peptídica. A sequência de execução da HPLC deve ser configurada para manter o tempo de análise da HPLC menor do que 30 horas. Para a configuração de HPLC usada no estudo de validação e descrita nesta diretriz, até 26 amostras de análise podem ser acomodadas em uma única execução de HPLC (ver parágrafo 17). Um exemplo de sequência de análise de HPLC é fornecido no anexo 3.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação de dados

25. A concentração de peptídeo de cisteína e lisina é determinada fotometricamente a 220nm em cada amostra, medindo a área do pico (área sob a curva,

AUC) dos picos apropriados e calculando-se a concentração do peptídeo, utilizando a curva de calibração linear derivada dos padrões.

26. A percentagem de depleção do peptídeo é determinada em cada amostra, medindo a área do pico e dividindo-a pela área média do pico dos controles de referência relevantes C (ver anexo 3), de acordo com a fórmula descrita abaixo.

[2] *Por média, se entende média aritmética.*

$$\text{Porcentagem de depleção do peptídeo} = \left[1 - \left(\frac{\text{Área de pico do peptídeo na injeção replicada}}{\text{Area média de pico de peptídeo no controle de referência C}}\right)\right] * 100$$

Critérios de aceitação

27. Os seguintes critérios devem ser atendidos para que uma execução seja considerada válida: a) a curva de calibração padrão deve ter r^2>0,99; b) a porcentagem média do valor de depleção do peptídeo das três repetições para o controle positivo de aldeído cinâmico deve estar entre 60,8% e 100%, para o peptídeo cisteína, e entre 40,2% e 69,0%, para o peptídeo lisina, e o desvio padrão máximo (DP) para as replicações de controle positivo deve ser de ± 14,9%, para a depleção percentual de cisteína, e de ± 11,6%, para a porcentagem depleção de lisina; e c) a concentração média de peptídeo de controles de referência A deve ser de 0,50 ± 0,05mM e o coeficiente de variação (CV) de áreas de pico de peptídeo, para os nove controles de referência B e C em acetonitrila, deve ser de ± 15,0%. Se um ou mais desses critérios não forem atendidos, a execução deve ser repetida.

28. Os seguintes critérios devem ser atendidos para que os resultados de uma substância química sejam considerados válidos: a) o desvio padrão máximo para as amostras testadas deve ser de ± 14,9%, para a depleção percentual de cisteína, e de ± 11,6%, para a porcentagem de depleção de lisina; b) a concentração média de peptídeos, dos três controles de referência C no solvente apropriado, deve ser de 0,50 ± 0,05mM. Se esses critérios não forem atendidos, os dados devem ser rejeitados e a execução deve ser repetida para essa substância química específica.

Modelo de previsão

29. Calcula-se o valor médio da percentagem de cisteína e de depleção percentual da lisina para cada substância química em teste. Depleção negativa é considerada como "0" ao se calcular a média. Utilizando o modelo de previsão de cisteína 1:10 / lisina 1:50 apresentado na tabela 1, o limiar de 6,38% de depleção média de peptídeos deve ser utilizado para apoiar a discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores cutâneos no âmbito de um AITA. A aplicação do modelo de previsão para atribuir uma substância química em teste a uma classe de reatividade (isto é, baixa, moderada e elevada reatividades) pode, talvez, ser útil para informar a avaliação da potência no quadro de um AITA.

Tabela 1: Modelo de predição de cisteína 1:10 / lisina 1:50[1]

Média da depleção de cisteína e de lisina	Classe de Reatividade	Previsão DPRA[2]
0% ≤ % depleção média ≤ 6.38%	Sem reatividade ou reatividade mínima	Negativo
6.38% < % depleção média ≤22.62%	Baixa reatividade	Positivo
22.62% < % depleção média ≤ 42.47%	Reatividade moderada	
42.47% < % depleção média ≤ 100%	Alta reatividade	

[1] Os números referem-se a valores limiares gerados estatisticamente e não estão relacionados com a precisão da medição.

[2] Uma previsão de DPRA deve ser considerada no âmbito de um AITA e de acordo com as disposições dos parágrafos 9 e 12.

30. Podem existir casos em que a substância química em estudo (a substância ou um ou vários dos componentes de uma substância multiconstituinte ou mistura) absorve significativamente a 220nm e tem o mesmo tempo de retenção do peptídeo (coeluição). A coeluição pode ser resolvida ajustando-se ligeiramente o conjunto de HPLC, de modo a separar ainda mais o tempo de eluição da substância química de teste e do peptídeo. Se uma configuração alternativa de HPLC for usada para tentar resolver a coeluição, sua equivalência com a configuração validada deve ser demonstrada (por exemplo, testando-se as substâncias de proficiência no anexo 2). Quando ocorre a coeluição, o pico do peptídeo não

pode ser integrado e o cálculo da percentagem de depleção não é possível. Se a coeluição de tais substâncias químicas em teste ocorrer com os peptídeos de cisteína e de lisina, então a análise deve ser relatada como inconclusiva. Nos casos em que a coeluição ocorre apenas com o peptídeo da lisina, pode utilizar-se o modelo de previsão da cisteína 1:10 referido na tabela 2.

Tabela 2: Modelo de predição de cisteína 1:10[1]

% depleção de cisteína (Cis)	Classe de Reatividade	Previsão DPRA[2]
0% ≤ % depleção ≤ 13.89%	Sem reatividade ou reatividade mínima	Negativo
13.89% < % depleção ≤ 23.09%	Baixa reatividade	Positivo
23.09% < % depleção ≤ 98.24%	Reatividade moderada	
98.24% < % depleção ≤ 100%	Alta reatividade	

[1] Os números referem-se a valores limiares gerados estatisticamente e não estão relacionados com a precisão da medição.

[2] Uma previsão de DPRA deve ser considerada no âmbito de um AITA e de acordo com as disposições dos parágrafos 9 e 12.

Pode haver outros casos em que a sobreposição no tempo de retenção entre a substância química em estudo e qualquer um dos peptídeos esteja incompleta. Nestes casos, os valores percentuais de depleção de peptídeos podem ser estimados e utilizados no modelo de previsão de cisteína 1:10 / lisina 1:50, embora a atribuição da substância química em teste a uma classe de reatividade não possa ser feita com precisão.

32. Uma única análise por HPLC para o peptídeo da cisteína e da lisina deve ser suficiente para uma substância química em teste quando o resultado é inequívoco. No entanto, em casos de resultados próximos ao limiar usado para discriminar entre resultados positivos e negativos (isto é, resultados limítrofes), testes adicionais podem ser necessários. Se as situações em que a depleção média percentual cai na faixa de 3% a 10%, para o modelo de previsão de cisteína 1:10 / lisina 1:50, ou a depleção percentual de cisteína cai na faixa de 9% a 17%, para o modelo de previsão da cisteína 1:10, uma segunda execução de teste deve ser considerada, bem como uma terceira, no caso de resultados discordantes entre as duas primeiras execuções.

Relatório de teste

33. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

Teste químico

- Substância monoconstituinte
  - Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS, SMILES
  - Código InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores
  - Aspecto físico, solubilidade em água, peso molecular e outras informações relevantes
  - Propriedades físico-químicas, na medida do possível
  - Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente praticável, etc.
  - Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
  - Concentração(ões) testada(s)
  - Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível.

- Substância multiconstituinte, UVCB e mistura:
  - Caracterização, tanto quanto possível – por exemplo, identidade química (ver acima), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver acima) – dos constituintes, na medida do possível; aparência física, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida do disponível
  - Peso molecular ou peso molecular aparente no caso de misturas/polímeros conhecidos, composições ou outras informações relevantes para a condução do estudo
  - Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
  - Concentração(ões) testada(s)
  - Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível

- Controles

Controle positivo

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS, SMILES
- Código InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores
- Aspecto físico, solubilidade em água, peso molecular e outras informações relevantes, propriedades físico-químicas, na medida do possível
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e factível, etc.
- Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
- Concentração testada
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
- Referência aos resultados de controle positivo, históricos que demonstram os critérios de aceitação e de execução, se aplicável

Solvente/veículo

- Solvente/veículo utilizado e proporção de seus constituintes, se aplicável
- Identificação de substâncias químicas, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS e/ou outros identificadores
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e factível, etc.
- Aspecto físico, peso molecular e propriedades físico-químicas relevantes adicionais, no caso de serem utilizados outros solventes/veículos diferentes dos mencionados na diretriz e na medida do disponível
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
- Justificativa para a escolha do solvente para cada substância química em estudo
- Para acetonitrilo, resultados de teste de impacto na estabilidade peptídica

- Preparação de peptídeos, controle positivo e teste químico
  - Caracterização de soluções peptídicas (fornecedor, lote, peso exato do peptídeo, volume adicionado para solução em estoque)
  - Caracterização da solução de controle positivo (peso exato da substância de controle positiva, volume adicionado para a solução em teste)
  - Caracterização de soluções químicas em teste (peso exato do teste químico, volume adicionado para a solução em teste)

- Configuração e análise de instrumentos de HPLC
  - Tipo de equipamento de HPLC, HPLC e colunas de guarda, detector, amostrador automático
  - Parâmetros relevantes para a análise de HPLC, como temperatura da coluna, volumes de injeção, vazão, taxa e gradiente

- Adequação do sistema
  - Área de pico do peptídeo a 220nm de cada padrão e controle de referência A replicado
  - Curva de calibração linear representada graficamente e o r^2 reportado
  - Concentração de peptídeos de cada replicado controle de referência A
  - Concentração média de peptídeo (mM) dos três controles de referência A, SD e CV
  - Concentração de peptídeos dos controles de referência A e C

- Sequência de análise

Para controles de referência:

  - Área de pico do peptídeo a 220nm de cada replicado B e C
  - Área média do pico do peptídeo em 220nm dos nove controles de referência B e C em acetonitrila
  - SD e CV (para estabilidade dos controles de referência ao longo do tempo de análise)
  - Para cada solvente utilizado, a área média do pico do peptídeo a 220nm dos três controles de referência C (para o cálculo da percentagem de depleção de peptídeos)
  - Para cada solvente utilizado, a concentração de peptídeo (mM) das três referências apropriadas de controle C
  - Para cada solvente utilizado, a concentração média de peptídeo (mM) dos três controles de referência C, SD e CV

Para controle positivo:

  - Área de pico do peptídeo a 220nm de cada réplica

- Percentagem de depleção de peptídeos de cada replicado
- Porcentagem média de depleção de peptídeos das três repetições, SD e CV

Para cada substância química em teste:

- Aparecimento do precipitado na mistura de reação no final do período de incubação, se observado. Se o precipitado foi ressolubilizado ou centrifugado
- Presença de coeluição
- Descrição de quaisquer outras observações relevantes, se aplicável
- Área de pico do peptídeo a 220nm de cada réplica
- Percentagem de depleção de peptídeo de cada replicado
- Média da percentagem de depleção de peptídeo das três replicações, SD e CV
- Média dos valores percentuais de depleção de cisteína e percentual de lisina
- Modelo de previsão utilizado e previsão DPRA

- Teste de proficiência
  - Se aplicável, o procedimento usado para demonstrar a proficiência do laboratório na execução do método de teste (por exemplo, testando as substâncias de proficiência) ou para demonstrar o desempenho reproduzível do método de teste ao longo do tempo

- Discussão dos resultados
  - Discussão dos resultados obtidos com o método de teste DPRA
  - Discussão dos resultados do método de teste no contexto de um AITA, se outras informações relevantes estiverem disponíveis

- Conclusão

LITERATURA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_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, OECD, Paris.

(3) OECD (1992). Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nº 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nº 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(5) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nº 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(6) OECD (2010), Skin Sensitisation: BrdU-ELISA: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nº 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(7) Adler et al. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick et al. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick et al. (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurlecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assaydpra.

(11) Jaworska et al. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch et al. (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada et al. (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicol In Vitro. 2013 Mar;27(2):609-18. doi: 10.1016/j.tiv.2012.11.006. Epub 2012 Nov 10

(14) Ball et al (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: inte-

grating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-ofevidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin et al. (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvamrecommendations/ eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(19) Natsch et al. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible at: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070 107.pdf - 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report Nº 87).

ANEXO 1

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida de desempenho do método e

um aspecto de "relevância". O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância", para significar a proporção de resultados corretos de um método[21].

VRA (Via de Resultado Adverso)**:** sequência de eventos da estrutura química de uma substância química-alvo ou grupo de substâncias químicas semelhantes, através do evento de iniciação molecular a um resultado *in vivo* de interesse[2].

Curva de calibração: a relação entre o valor da resposta experimental e a concentração analítica (também chamada de curva padrão) de uma substância conhecida.

Coeficiente de variação: uma medida da variabilidade para um grupo de dados replicados, calculada pela divisão do desvio padrão pela média. Pode ser multiplicada por 100 para expressão como uma porcentagem.

Risco: propriedade inerente de um agente ou situação com potencial para causar efeitos adversos quando organismo, sistema ou (sub)população é exposto a esse agente.

AITA (Abordagem Integrada de Testes e Avaliação): uma abordagem estruturada usada para identificação de risco (potencial), caracterização do risco (potência) e/ou avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de uma substância química ou grupo de substâncias químicas, que integra e pondera estrategicamente todos os dados relevantes para informar a decisão regulatória com relação ao risco potencial e/ou a necessidade de outros testes.

Evento de iniciação molecular: perturbação induzida por substâncias químicas de um sistema biológico em nível molecular identificado como o evento inicial na via de resultados adversos.

Mistura: uma mistura ou solução composta de duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem[1].

Substância monoconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que um constituinte principal está presente em pelo menos 80% (p/p).

Substância multiconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que mais de um constituinte principal está presente numa concentração ≥10% (p/p) e <80% (p/p). Uma substância multiconstituinte é o resultado de um processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela mistura de duas ou mais substâncias sem reação química. Uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

Controle positivo (CP): um replicado contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para garantir que essa variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser demasiada.

Controle de referência: uma amostra não tratada contendo todos os componentes de um sistema de teste, incluindo o solvente ou veículo que é processado com a substância química em teste e, outras amostras de controle, para estabelecer a resposta da linha de base para as amostras tratadas com a substância química dissolvida no mesmo solvente ou veículo. Quando testada com um controle negativo concorrente, esta amostra também demonstra se o solvente ou veículo interage com o sistema de teste.

Relevância: descrição da relação do teste com o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a medida de que o teste confere ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[21].

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado reprodutivelmente, dentro e entre laboratórios, ao longo do tempo, utilizando o mesmo protocolo. Avalia-se calculando as reprodutibilidades intra e interlaboratorial e intralaboratorial[21].

Reprodutibilidade: a concordância entre os resultados obtidos, de testar a mesma substância usando o mesmo protocolo de teste (ver confiabilidade)[21].

Sensibilidade: é a proporção de todas as substâncias químicas em teste positivas/ativas que são classificadas corretamente. É uma medida de precisão para

um método de ensaio que produza resultados categóricos de grande importância na avaliação da relevância [21].

Especificidade: proporção de todas as substâncias químicas negativas/inativas que são classificadas corretamente pelo teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produza resultados categóricos importantes na avaliação da relevância de um método[21].

Substância: são elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas decorrentes do processo utilizado; mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou sem alterar sua composição[1].

Adequação do sistema: determinação do desempenho do instrumento (por exemplo, sensibilidade) pela análise de uma referência padrão antes de executar o lote analítico[22].

Substância química de teste: o termo "teste químico" é usado para se referir ao que está sendo testado.

Sistema Global Harmonizado das Nações Unidas de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS da ONU): um sistema que propõe a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas), de acordo com tipos e níveis padronizados de riscos físicos, de saúde e ambientais, abordando elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, frases de perigo, frases de precaução e fichas de segurança, de modo a transmitir informações sobre os seus efeitos adversos, com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o meio ambiente[1].

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

Método de teste válido: um método de teste considerado como tendo relevância e confiabilidade suficientes para um propósito específico e que é baseado em

princípios cientificamente sólidos. Um método de teste nunca é válido em um sentido absoluto, mas apenas em relação a um propósito definido[21].

ANEXO 2

Substâncias de proficiência

Em Sensibilização Cutânea in Chemico: Ensaio Direto de Reatividade do Peptídeo

Antes do uso rotineiro do método de teste descrito nesta diretriz, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica obtendo corretamente a previsão de DPRA esperada, para as 10 substâncias de proficiência recomendadas na tabela 1, e obtendo valores de depleção de cisteína e lisina dentro da respectiva faixa de referência, para 8 das 10 substâncias de proficiência para cada peptídeo. Essas substâncias de proficiência foram selecionadas para representar a faixa de respostas para os riscos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção escolhidos foram que estas substâncias devem estar disponíveis comercialmente, que os dados de referência de alta qualidade *in vivo* e *in vitro*, gerados com o DPRA, também estejam disponíveis e que eles tenham sido usados no estudo de validação, coordenada pelo EURL do ECVAM, para demonstrar a implementação bem-sucedida do método de teste nos laboratórios participantes do estudo.

Tabela 1: Substâncias de proficiência recomendadas para demonstração de proficiência técnica com o Ensaio de Reatividade Direta com Peptídeos

Substância de proficiência	CASRN	Estado físico	Predição *In vivo*[1]	Previsão DPRA[2]	Faixa[3] de % de depleção de peptídeo de cisteína	Faixa[3] de % de depleção de peptídeo de lisina
2,4-dinitro-cloroben-zeno	97-00-7	Sólido	Sensível (extremo)	Positivo	90-100	15-45
Oxazolona	15646-46-5	Sólido	Sensível (extremo)	Positivo	60-80	10-55
Formaldeído	50-00-0	Liquido	Sensível (forte)	Positivo	30-60	0-24
Benzilide-noacetona	122-57-6	Sólido	Sensível (moderado)	Positivo	80-100	07

Farnesal	19317-1--4	Liquido	Sensível (fraco)	Positivo	15-55	0-25
2,3-Butano-diona	431-03-8	Liquido	Sensível (fraco)	Positivo	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Liquido	Não sensível	Negativo	0-7	0-55
6-metilcu-marina	92-48-8	Sólido	Não sensível	Negativo	0-7	0-55
Ácido láctico	50-21-5	Liquido	Não sensível	Negativo	0-7	0-55
4-metoxia-cetofenona	100=06=1	Sólido	Não sensível	Negativo	0-7	0-55

[1] As previsões de risco e (potência) in vivo *são baseadas em dados de LLNA[(19)]. A potência* in vivo *é derivada usando-se os critérios propostos pelo ECETOC[(23)].*

[2] Uma previsão de DPRA deve ser considerada no âmbito de um AITA e de acordo com as disposições dos parágrafos 9 e 11.

[3] Gamas determinadas com base em pelo menos 10 valores de depleção gerados por 6 laboratórios independentes.

ANEXO 3

Exemplos de sequência de análise

Calibragem padrão e controles de referência	STD1
	STD2
	STD3
	STD4
	STD5
	STD6
	Tampão de diluição
	Controle de referência A, rep 1
	Controle de referência A, rep 2
	Controle de referência A, rep 3
Controles de co-eluição	Controle de co-eluição 1 para substância química de teste 1
	Controle de co-eluição 1 para substância química de teste 2

Controles de referência	Controle de referência B, rep 1
	Controle de referência B, rep 2
	Controle de referência B, rep 3
Primeiro conjunto de réplicas	Controle de referência C, rep 1
	Aldeído cinâmico, rep 1
	Amostra 1, rep 1
	Amostra 2, rep 1
Segundo conjunto de réplicas	Controle de referência C, rep 2
	Aldeído cinâmico, rep 2
	Amostra 1, rep 2
	Amostra 2, rep 2
Terceiro conjunto de réplicas	Controle de referência C, rep 3
	Aldeído cinâmico, rep 3
	Amostra 1, rep 3
	Amostra 2, rep 3
Controles de referência	Controle de referência B, rep 4
	Controle de referência B, rep 5
	Controle de referência B, rep 6

Três conjuntos de controles de referência (isto é, amostras constituídas apenas pelo peptídeo dissolvido no solvente apropriado) devem ser incluídos na sequência de análise:

Controle de referência A: usado para verificar a adequação do sistema de HPLC.

Controle de referência B: incluído no início e no final da sequência de análise para verificar a estabilidade dos controles de referência durante o tempo de análise.

Controle de referência C: incluído na sequência de análise para verificar se o solvente utilizado para dissolver a substância química em teste não tem impacto no percentual de depleção do peptídeo.

Adotado: 25 de junho de 2018

Guia da OECD para o ensaio de substâncias químicas - 442D

Ensaios de sensibilização cutânea in vitro que abordam o evento AOP chave sobre a ativação do queratinócito

INTRODUÇÃO GERAL

Diretriz de Teste de Ativação de Queratinócitos Baseada em Evento

1. Um sensibilizante cutâneo refere-se a uma substância que conduz a uma resposta alérgica, depois de repetidos contatos com a pele, conforme definido pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS) das Nações Unidas (ONU)[(1)]. Existe consenso sobre os principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. O conhecimento atual dos mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea foi resumido no documento Via de Evento Adverso (VEA)[(2)], começando com o evento de iniciação molecular através de ocorrências intermediárias para o efeito adverso, ou seja, dermatite alérgica de contato. Esta VEA foca-se em substâncias químicas que reagem com tiol (cisteína) e aminas primárias (lisina) tais como: substâncias químicas orgânicas. Neste caso, o evento de iniciação molecular (o primeiro evento-chave) é a ligação covalente de substâncias eletrofílicas a centros nucleofílicos em proteínas da pele. O segundo evento-chave nesta VEA ocorre nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como alterações na expressão gênica, associadas a vias específicas de sinalização celular, como as vias dependentes de antioxidante/elemento de resposta eletrofílica (ARE). O terceiro evento-chave é a ativação de células dendríticas, tipicamente avaliadas pela expressão de marcadores específicos de superfície celular, quimiocinas e citocinas. O quarto evento-chave é a proliferação de células T[(3)].

2. Esta Diretriz de Teste (DT) descreve ensaios *in vitro* que abordam os mecanismos dispostos no segundo evento-chave da VEA para a sensibilização cutânea, nomeadamente a ativação dos queratinócitos[(2)]. A Diretriz de Teste inclui métodos a serem usados para apoiar a discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores cutâneos, de acordo com o GHS[(1)].

Os métodos de teste atualmente descritos nesta Diretriz de Teste são:

- O método de ensaio ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ (apêndice IA)
- O método do ensaio ARE-Nrf2 luciferase LuSens (apêndice IB)

3. Estes dois métodos de teste de luciferase ARE-Nrf2 *in vitro* foram considerados cientificamente válidos. O método de teste KeratinoSens™ foi submetido a um estudo de validação, seguido por uma atualização independente do Comitê Científico Consultivo do CEVAM (ESAC) e por recomendações positivas do ECLV do EURL, sendo considerado o método de referência validado (MRV)[3-6]. O método de teste LuSens foi posteriormente submetido a um estudo de validação baseado no Padrão de Desempenho, atualizado, e recebeu um parecer positivo do ESAC[7-10].

4. Os métodos de teste incluídos nesta Diretriz podem diferir em relação ao procedimento usado para gerar os dados e as leituras medidas, mas podem ser usados indiscriminadamente para atender aos requisitos dos países quanto aos resultados sobre eventos-chave de ativação de queratinócitos na VEA na sensibilização cutânea, enquanto se beneficia da Aceitação Mútua de Dados.

Antecedentes e princípios dos métodos incluídos nas Diretrizes de Teste baseados em eventos-chave

5. A avaliação da sensibilização cutânea envolve tipicamente o uso de animais de laboratório. Os métodos clássicos que utilizam cobaias, o Teste de Maximização de Cobaia (GPMT), de Magnusson e Kligman, e o Teste de Buehler (OECD DT 406)[11], avaliam as fases de indução e de eliciação da sensibilização cutânea. Os testes com camundongos, o LLNA (OECD DT 429)[12] e as suas três modificações não radioativas, LLNA: DA (OECD DT 442A)[13], LLNA: BrdU-ELISA e BrdU-FCM (OECD DT 442B)[14], avaliam a resposta de indução exclusivamente e ganharam aceitação, uma vez que fornecem vantagem sobre os testes em camundongos em termos de bem-estar animal, juntamente com uma medida objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.

6. Métodos de teste mecanicamente baseados *in chemico* e *in vitro,* abordando os três primeiros eventos-chave da VEA de sensibilização cutânea, foram adotados para contribuir na avaliação do potencial de risco de sensibilização cutânea a substâncias químicas. A DT 442C descreve o Ensaio de Reatividade Direta do Peptídeo[15] que aborda o primeiro evento-chave.

Esta Diretriz de Teste avalia a ativação dos queratinócitos, abordando o segundo evento-chave, e a DT 442E aborda a ativação de células dendríticas, que é o terceiro evento-chave da sensibilização cutânea VEA[16]. Finalmente, o quarto evento-chave, que representa a proliferação de células T, é avaliado indiretamente no ensaio de linfonodo local do camundongo (LLNA)[12].

7. Como a ativação de queratinócitos representa apenas um evento-chave da sensibilização cutânea VEA[2-17], a informação gerada com métodos de teste desenvolvidos para tratar este evento-chave específico pode não ser suficiente para concluir sobre a presença ou a ausência de sensibilização cutânea de alguns substâncias químicas potenciais. Por conseguinte, os dados gerados com os métodos de ensaio descritos na presente Diretriz de Teste são propostos para apoiar a discriminação entre os sensibilizadores cutâneos (categoria 1 do GHS) e os não sensibilizantes, quando utilizados nas Abordagens Integradas de Testes e Avaliação (AITA), juntamente com outras informações complementares relevantes, como informação derivada de ensaios *in vitro* abordando outros eventos importantes da VEA de sensibilização cutânea, além de métodos sem testes, incluindo a leitura comparativa de análogos químicos[17]. Exemplos sobre o uso de dados gerados com esses métodos dentro de Abordagens Definidas, ou seja, abordagens padronizadas, tanto em relação ao conjunto de fontes de informação utilizadas, quanto no procedimento aplicado para derivar previsões, foram publicados[17] e podem ser empregados como elementos úteis dentro da AITA.

8. Os métodos de teste descritos nesta Diretriz não podem ser usados isoladamente, nem para subcategorizar os sensibilizadores cutâneos nas subcategorias 1A e 1B, definidas pelo GHS[1], para autoridades que implementam essas duas subcategorias opcionais, nem para prever a potência para decisões de avaliação de segurança. No entanto, dependendo do quadro regulamentar, os resultados positivos gerados com estes métodos podem ser utilizados isoladamente para classificar uma substância química na categoria 1 do GHS.

9. O termo "substância química em estudo" é utilizado nesta Diretriz de Teste para se referir ao que está sendo testado[1] e não está relacionado com a aplicabilidade dos métodos de ensaio ao teste de substâncias monoconstituinte, substâncias multiconstituinte e/ou misturas. Ao se testar em culturas submersas, deve-se determinar se a substância química em estudo está dissolvida no meio de exposição ou se, pelo menos, forma uma dispersão estável (através da inspeção visual da substância química em estudo dissolvida/preparada à concentração final máxima de ensaio no meio de exposição), mostrando que não permanecem resíduos não dissolvidos e que não se forma precipitado ou separação de fases se a solução for deixada em repouso durante várias horas.

10. Está disponível informação limitada sobre a aplicabilidade dos métodos de en-

saio a substâncias/misturas multiconstituintes[18-20]. Apesar de não serem avaliados nos estudos de validação, os métodos de ensaio podem, no entanto, ser tecnicamente aplicáveis ao teste de substâncias e misturas multiconstituintes. Ao considerar o teste de misturas, substâncias químicas difíceis de testar (instáveis) ou substâncias químicas de teste não claramente dentro do domínio de aplicabilidade descrito nesta Diretriz, deve-se considerar se os resultados de tais testes produzirão resultados que sejam cientificamente significativos. Além disso, ao testar substâncias ou misturas multiconstituintes, deve se considerar a possível interferência de constituintes citotóxicos nas respostas observadas (por exemplo, a presença de elevado teor de constituintes citotóxicos não sensibilizadores pode mascarar a resposta de componentes sensibilizadores fracos ou componentes sensibilizadores presentes em baixa concentração). Dependendo do caso específico, pode ser cientificamente justificado testar os constituintes individuais mais importantes que formam a fração principal ou várias frações da mistura, para concluir sobre o potencial de sensibilização da mistura complexa.

[1] Em junho de 2013, a Reunião Conjunta concordou que, sempre que possível, um uso mais consistente do termo "substância química de teste", descrevendo o que está sendo testado, deveria ser aplicado em Diretrizes de Teste novas e atualizadas.

LITERATURA

1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]

2) 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. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

3) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

4) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. In Vitro 25, 733-744.

5) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology 33, 1337-1352.

6) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam- recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation].

7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. Toxicol *In Vitro* 28, 1482-1497.

8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. Toxicol *In Vitro* 32, 278-286.

9) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016- 04_lusens_final.pdf].

10) OECD (2015). Guidance Document Nº 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-NrF2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing- assessment-publications-number.htm

11) OECD (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Nº 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

12) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing Nº 429. Skin sensitization: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

13) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing Nº 442A. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooper-

ation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/test-guidelines].

14) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing Nº 442B. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

15) OECD (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nº 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

16) OECD (2017). OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nº 442E: *In Vitro* Skin Sensitisation assays addressing the VEAKey Event on Activation of Dendritic Cells. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

17) OECD (2016). Series on Testing & Assessment Nº 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used With in 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. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass].

18) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSensTM assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

19) Kolle, S.N., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2013). Alternative method in practice: Post-validation experience of the skin sensitization *in vitro* test strategy. Toxicology Letters 221, S204.

20) Settivari RS, Gehen SC, Amado RA, Visconti NR, Boverhof DR, Carney EW (2015). Application of the KeratinoSensTM assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. Regul Toxicol Pharmacol; 72(2):350-60.

Anexo I – definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de "relevância". O termo é frequentemente usado, de forma

intercambiável com "concordância", para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste[3].

VEA (via de evento/resultado adverso): sequência de eventos da estrutura química de uma substância química-alvo ou grupo de substâncias químicas semelhantes, através do evento de iniciação molecular para um desfecho *in vivo* de interesse[2].

ARE: o elemento de resposta antioxidante (também chamado de EpRE, elemento de resposta eletrófilo), é um elemento de resposta encontrado na região promotora de *upstream* de muitos genes citoprotetores e de fase II. Quando ativado por Nfr2, intermedia a indução transcricional desses genes.

CV: viabilidade celular.

Coeficiente de variação: uma medida de variabilidade calculada para um grupo de dados réplicas, dividindo o desvio padrão pela média. Pode ser multiplicado por 100 para expressão como uma porcentagem.

CV_{75}*:* a concentração estimada, resultando em 75% de viabilidade celular.

$EC_{1.5}$*:* concentração interpolada, resultando numa indução de 1,5 vezes em luciferase.

[Fator de] Indução de atividade de luciferase: representa a razão de luminescência de células tratadas (menos em branco/vazia) sobre a luminescência das células expostas ao controle de solvente/veículo concorrente (menos em branco/vazia).

IC_{30}: concentração efetuando uma redução da viabilidade celular em 30%.

IC_{50}*:* concentração efetuando uma redução da viabilidade celular em 50%.

Risco: propriedade inerente de um agente ou situação que tem o potencial de causar efeitos adversos quando um organismo, sistema ou (sub) população é exposto a esse agente.

AITA (Abordagem Integrada de Testes e Avaliação): uma abordagem estruturada usada para identificação de riscos (potencial), caracterização de riscos (potência)

e/ou avaliação de segurança (potencial/potência e exposição) de uma substância química ou grupo de substâncias químicas, que se integre estrategicamente; pondera todos os dados relevantes para informar a decisão regulatória, com relação a riscos e/ou riscos em potencial e/ou a necessidade de mais testes específicos e, portanto, mínimos.

I_{max}: fator de indução máxima da atividade da luciferase comparado ao controle do solvente (negativo) medido em qualquer concentração química do teste.

Keap1: proteína 1 associada à ECH semelhante à Kelch. É uma proteína sensora que pode regular a atividade da Nrf2. Sob condições não induzidas, a proteína do sensor Keap1 visa o fator de transcrição de Nrf2 para a ubiquitinação e a degradação proteolítica no proteassoma. A modificação covalente dos resíduos de cisteína reativos de Keap 1 por moléculas pequenas pode levar à dissociação de Nrf2 de Keap1[4-6].

Mistura: uma mistura ou solução composta de duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem[1].

Substância monoconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, na qual um constituinte principal está presente em pelo menos 80% (p/p).

Substância multiconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que mais de um constituinte principal está presente na concentração ≥10% (p/p) e <80% (p/p). Uma substância multiconstituinte é o resultado de um processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela combinação de duas ou mais substâncias sem reação química. Uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

Controle negativo: uma amostra contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratada com uma substância conhecida por não induzir uma resposta positiva no sistema de teste. Esta amostra é processada com amostras tratadas com substâncias químicas de teste e outras amostras de controle.

Nrf2: fator nuclear (derivado de eritrócitos 2)-tipo 2, é um fator de transcrição envolvido na resposta antioxidante. Quando o Nrf2 não é ubiquitinado, ele se acumula no citoplasma e se transloca para o núcleo, onde se combina com o ARE

na região promotora de *upstream* de muitos genes citoprotetores, iniciando sua transcrição[4-6].

Padrões de desempenho: padrões baseados em um método de teste validado, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método de teste proposto que seja mecânica e funcionalmente similar. Incluem-se: (i) componentes essenciais do método de teste; (ii) uma lista mínima de substâncias químicas de referência selecionadas dentre as substâncias químicas usadas para demonstrar o desempenho aceitável do método de teste validado; e (iii) os níveis comparáveis de exatidão e confiabilidade, com base no que foi obtido, para o método de teste validado, que o método de teste proposto deve demonstrar quando avaliado usando a lista mínima de substâncias químicas de referência[3].

Controle positivo: uma réplica contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser exagerada.

Substâncias químicas de proficiência: um subconjunto das substâncias químicas de referência incluídas nos Padrões de Desempenho que podem ser usadas pelos laboratórios para demonstrar competência técnica com um método de teste padronizado. Os critérios de seleção para essas substâncias geralmente incluem que representem a faixa de respostas, estejam disponíveis comercialmente e tenham dados de referência disponíveis de alta qualidade.

Substâncias químicas de referência: um conjunto de substâncias químicas a serem usadas para demonstrar a capacidade de um novo método de teste para atender aos critérios de aceitabilidade demonstrados pelo(s) método(s) de teste de referência validado(s). Essas substâncias químicas devem ser representativas das classes de substâncias químicas para os quais se espera que o método de teste seja usado e devem representar toda a gama de respostas que podem ser esperadas das substâncias químicas para os quais podem ser usadas, de forte a fraco, ou até negativo.

Relevância: descrição da relação do teste com o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a medida de que o teste mede ou

prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[3].

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado reprodutivelmente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, usando o mesmo protocolo. Avalia-se calculando as reprodutibilidades intra e interlaboratorial e a reprodutibilidade intralaboratorial[3].

Reprodutibilidade: a concordância entre os resultados obtidos, de testar a mesma substância usando o mesmo protocolo de teste (ver confiabilidade)[3].

Sensibilidade: a proporção de todos as substâncias químicas positivas/ativas que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produza resultados categóricos, sendo uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[3].

Controle de solvente/veículo: uma réplica contendo todos os componentes de um sistema de teste, exceto a substância química em teste, mas incluindo o solvente que é usado. É utilizado para estabelecer a resposta da linha de base para as amostras tratadas com a substância química em teste dissolvidas no mesmo solvente.

Especificidade: a proporção de todos as substâncias químicas negativas/inativos que são classificadas corretamente pelo método de teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produza resultados categóricos, sendo uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[3].

Substância: elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo usado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou sem alterar a sua composição[1].

Substância química em teste: o termo "substância química" é usado para se referir ao que está sendo testado.

Sistema Globalmente Harmonizado das Nações Unidas de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS da ONU): um sistema que propõe a classifica-

ção de substâncias químicas (substâncias e misturas), de acordo com tipos e níveis padronizados de riscos físicos, de saúde e ambientais, e abordando elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, declarações de risco, declarações de precaução e fichas de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o ambiente[1].

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

Método de referência validado (MRV): o(s) primeiro(s) método(s) endossado(s) como cientificamente válido(s) e usado(s) como referência para estudos de validação baseados em desempenho.

Método de teste válido: um método de teste considerado como tendo relevância e confiabilidade suficientes para um propósito específico e que é baseado em princípios cientificamente sólidos. Um método de teste nunca é válido em sentido absoluto, mas apenas em relação a um propósito definido[3].

Xeno-free: que não contém nenhum elemento que não seja da mesma espécie que as células usadas, neste caso, humano.

LITERATURA

1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]

2) 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. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

3) 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

4) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

5) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

6) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1, 45-49.

APÊNDICE IA: SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO: A LUCIFERASE ARE-NRF2

Método de Teste KeratinoSens™

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

1. O método de teste, descrito neste Apêndice da Diretriz de Teste 442D, aborda o segundo evento-chave da VEA da sensibilização cutânea[1] – ativação de queratinócitos – avaliando a ativação mediada por Nrf2 do elemento de resposta antioxidante (RAE) – gene dependentes, com a ajuda da luciferase. Sensibilizadores cutâneos foram relatados como indutores de genes que são regulados pelos ARE[2-3]. Pequenas substâncias eletrofílicas, tais como sensibilizadores cutâneos, podem atuar no sensor da proteína Keap1 (proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch); por exemplo, a modificação do covalente do resíduo de cisteína, resultando na sua dissociação do fator de transcrição Nrf2 (fator 2 relacionado com fator nuclear eritróide 2). O Nrf2 dissociado pode ativar genes dependentes de ARE, tais como aqueles que codificam enzimas desintoxicantes de fase II[2;4-5].

2. O método de teste *in vitro* ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ (doravante denominado método de teste KeratinoSens™) foi submetido a estudos de validação[3; 6-7], seguidos por uma revisão independente, conduzida pelo Laboratório de Referência da União Europeia para Alternativas a Testes em Animais (EURL ECVAM)[8]. O método de teste KeratinoSens™ foi considerado cientificamente válido para ser usado como parte de um AITA, para apoiar a discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores cutâneos para fins de identificação de riscos[8].

3. Com base no conjunto de dados do estudo de validação e no teste interno utili-

zado para a revisão independente por pares, o método KeratinoSens™ provou ser transferível para laboratórios experientes em técnicas de cultura celular[8]. O nível de reprodutibilidade nas previsões que podem ser esperadas do método de teste KeratinoSens™ é da ordem de 85% dentro de e entre laboratórios[8]. A precisão (77% - 155/201), a sensibilidade (78% - 71/91) e a especificidade (76% - 84/110) do método de teste KeratinoSens™ para discriminar sensibilizadores cutâneos (isto é, Cat. 1 GHS da ONU) de não sensibilizadores, quando comparadas com os resultados do LLNA, foram calculadas, considerando todos os dados submetidos ao ECLV do EURL para avaliação e revisão por pares do método de teste[8]. Estes números são semelhantes aos publicados, com base em testes internos, de cerca de 145 substâncias de teste (77% de precisão, 79% de sensibilidade, 72% de especificidade)[7].

Esta informação indica a utilidade do método de teste KeratinoSens™ para contribuir para a identificação do risco de sensibilização cutânea. No entanto, os valores de precisão fornecidos aqui, para o método de teste KeratinoSens™ como um método independente, são apenas indicativos, pois o método de teste deve ser considerado em combinação com outras fontes de informação, no contexto de uma Abordagem Definida ou AITA e de acordo com as disposições dos parágrafos 7 e 8 na Introdução Geral desta Diretriz. Além disso, ao avaliar métodos não animais para a sensibilização cutânea, deve-se ter em mente que o teste LLNA, bem como outros testes em animais, podem não refletir totalmente a situação em humanos.

4. Com base nos dados atuais disponíveis, o método de teste KeratinoSens™ mostrou ser aplicável a substâncias químicas em teste abrangendo uma variedade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potência de sensibilização cutânea (conforme determinada em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas[3;6-8]. O método de ensaio é aplicável a substâncias químicas solúveis ou que formam uma dispersão estável no meio de exposição (isto é, um coloide ou uma suspensão em que a substância química em teste não se deposita ou se separa do solvente em diferentes fases). As substâncias químicas que não preencham esta condição na mais alta concentração requerida de 2.000μM podem ainda ser testadas em concentrações mais baixas. Nesse caso, os resultados que preenchem os critérios de positividade podem, ainda, ser usados para apoiar a identificação da substância química em teste como um sensibilizante cutâneo. Nos casos em que um resultado negativo é obtido em um teste com concentrações máximas $<$1.000μM e nenhuma citotoxicidade é alcançada, o resultado deve ser considerado inconclusivo (ver modelo de previsão no parágrafo 32). Se a citotoxicidade ($<$70% de viabilidade) for atingida na concentração máxima de teste

solúvel <1.000μM, os critérios para negatividade ainda podem ser aplicados. Em geral, substâncias monoconstituinte com um LogP acima de 7 podem ser insolúveis no meio de exposição; no entanto, se a solubilidade ou a dispersão estável puder ser obtida e documentada, o teste pode ainda ser conduzido.

5. Os resultados negativos devem ser interpretados com cautela, pois substâncias com uma reatividade exclusiva em relação aos resíduos de lisina podem ser detectadas como negativas pelo método de teste, dado que o mecanismo chave que leva à ativação da via Keap1-Nrf2-ARE parece ser a reação eletrofílica de estressores com tióis nucleofílicos (grupos cisteína sulfidrila) de Keap-1. A informação complementar, vinda dos ensaios de reatividade de peptídeos, pode ajudar a resolver esta incerteza, em particular ensaios capazes de distinguir entre reatividade de cisteína e de lisina.

Contudo, devido à limitada capacidade metabólica da linhagem celular utilizada[10] e devido às condições experimentais, pró-haptenos (substâncias químicas que requerem ativação enzimática, por exemplo, via enzimas P450) e pré-haptenos (substâncias químicas ativadas pelo auto-oxidação), em particular com uma taxa de oxidação lenta, também podem fornecer resultados negativos. No entanto, foi demonstrado que, em sua maioria, os pré-haptenos e os pró-haptenos são suficientemente bem identificados por uma combinação de métodos de teste de eventos 1, 2 e 3 no VEA, de modo que os resultados negativos podem, em geral, ser usados para apoiar a classificação[12;20;34]. Por outro lado, substâncias químicas em teste que não atuam como sensibilizantes, mas que, apesar disso, são estressoras químicas, podem levar a resultados falso positivos[8]. Finalmente, substâncias químicas de teste que interferem com a enzima luciferase podem confundir a atividade dessa enzima em ensaios baseados em células, causando inibição aparente ou aumento da luminescência[13]. Por exemplo, concentrações de fitoestrógenos superiores a 1μM foram relatadas como interferindo nos sinais de luminescência em outros ensaios de genes repórteres baseados em luciferase, devido à superativação do gene repórter de luciferase[14]. Como consequência, a expressão de luciferase obtida em altas concentrações de fitoestrogênios ou compostos semelhantes, suspeitos de produzir hiperativação do gene repórter da luciferase semelhante ao fitoestrógeno, precisa ser cuidadosamente examinada[14]. Nos casos em que a evidência pode ser demonstrada quanto a não aplicabilidade do método de teste KeratinoSens™ a outras categorias específicas de substâncias químicas de teste, o método de teste não deve ser usado para essas categorias específicas.

6. Além de apoiar a discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores cutâneos (Categoria 1 da GHS), o método de teste KeratinoSens™ também fornece informação de concentração-resposta, que pode potencialmente contribuir para a avaliação da potência sensibilizante, quando utilizada em abordagens integradas, como a AITA[11;15]. Exemplos de como usar os resultados do método de teste KeratinoSens™ em combinação com outras fontes de informação são relatados na literatura[7;11;16-20]. Especificamente, o uso dos dados dose-resposta do método de teste KeratinoSens™, juntamente com dados quantitativos de reatividade peptídica para avaliar a potência no LLNA e em testes em humanos, têm sido descrito[21] e usado em estratégias bayesianas de teste integrado na potência do LLNA[11; 22]. Além disso, a avaliação foi conduzida sobre como abordar especificamente a potência em humanos[23]. Finalmente, o uso do método de teste KeratinoSens™ para avaliar a potência de classes químicas específicas também foi descrito nas referências de números 21 a 24.

7. As definições são fornecidas no anexo 1 da Introdução Geral.

PRINCÍPIO DO TESTE

8. O método de teste KeratinoSens™ faz uso de uma linha celular imortalizada aderente, derivada de queratinócitos humanos, portadores estáveis de um gene repórter de luciferase sob o controle do elemento de resposta antioxidante do gene AKR1C2 humano[25]. Sabe-se que esse gene é regulado positivamente pelos sensibilizadores cutâneos[26-27]. A linhagem celular contém o gene da luciferase sob o controle transcricional de um promotor constitutivo fundido com o elemento ARE. O sinal da luciferase reflete a ativação por sensibilizadores de genes dependentes de Nrf2 endógenos, sendo que a dependência do sinal da luciferase na linhagem celular recombinante em Nrf2 foi demonstrada[28]. Isto permite a medição quantitativa (por detecção de luminescência) da indução do gene da luciferase, utilizando substratos de luciferase produtores de luz bem estabelecidos, como um indicador da atividade do fator de transcrição Nrf2 em células, após a exposição a substâncias de teste eletrofílicas.

9. Testes químicos são considerados positivos, no método de teste KeratinoSens™, se resultarem em indução estatisticamente significativa da atividade da luciferase acima de um determinado limiar ($\geq$1,5 vezes ou 50% de aumento), abaixo de concentração definida que não afete significativamente a viabilidade celular – abaixo de 1.000μM e em concentração na qual a viabilidade celular esteja acima

de 70%[3;6]. Para este propósito, a máxima indução da atividade da luciferase sobre o controle do solvente (negativo) (I_{max}) é determinada. Além disso, dado que as células são expostas a uma série de concentrações das substâncias químicas em teste, a concentração necessária para a indução estatisticamente significativa da atividade da luciferase acima do limiar (valor $EC_{1.5}$) deve ser interpolada a partir da curva dose-resposta obtida da série de concentrações da substância química em estudo (ver parágrafo 26 para cálculos). Finalmente, devem ser realizadas medições paralelas de citotoxicidade para avaliar se a indução da luciferase ocorre em concentrações subcitotóxicas.

10. Antes do uso rotineiro do método de teste KeratinoSens™ que esta Diretriz endereça, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, usando as dez Substâncias de Proficiência listadas no anexo 1 deste Apêndice.

11. Padrões de desempenho (PD)[29] estão disponíveis para facilitar a validação de métodos de teste de luciferase ARE-Nrf2 *in vitro*, novos ou modificados, semelhantes ao KeratinoSens™ MRV, e para permitir a alteração oportuna desta Diretriz para sua inclusão. A Aceitação Mútua de Dados (AMD) só será garantida para os métodos de teste validados de acordo com o PD, se esses métodos de teste tiverem sido atualizados e incluídos nesta Diretriz de Teste pela OECD.

PROCEDIMENTO

12. Um protocolo DB-ALM para o método de teste KeratinoSens™ está disponível e deve ser empregado ao se implementar e se usar o método de teste no laboratório[9]. Os laboratórios que implementam o método de teste podem obter a linha celular recombinante usada no método de teste KeratinoSens™ assinando uma concordância padrão com o desenvolvedor do método de teste[2], que inclui a licença para o uso comercial do gene da luciferase. O ensaio do gene repórter da luciferase também está sujeito a uma licença de uso limitado da Promega, que requer o uso de reagentes de ensaio luminescentes adquiridos da própria Promega. Os parágrafos a seguir fornecem uma descrição dos principais componentes e procedimentos do método de teste KeratinoSens™. Além disso, uma adaptação do método de ensaio KeratinoSens™ a condições de cultura isentas de xeno, utilizando reagentes humanos, é descrita no anexo 2 do presente apêndice[33]. No entanto, recomenda-se que as autoridades reguladoras relevantes sejam consultadas antes de decidir sobre o tipo de soro a ser utilizado no método de teste KeratinoSens™.

Preparação das culturas de queratinócitos

13. Deve ser utilizada a linha celular transgênica KeratinoSens™ com uma inserção estável do gene repórter de luciferase sob o controle do elemento ARE. Após o recebimento, as células KeratinoSens™ são propagadas, conforme definido pelo protocolo do método de teste (por exemplo, 2 a 4 passagens) e armazenadas congeladas como um material homogêneo. As células deste estoque original podem ser propagadas por até, no máximo, 25 passagens e são empregadas para testes de rotina, usando o meio de manutenção/crescimento (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco – DMEM, em inglês), contendo soro e geneticina, para permitir a manutenção do gene, conforme descrito no Protocolo - ALM do método do teste[9].

[2] Givaudan Schweiz AG, CH-8310 Kemptthal.

14. Para o teste, as células devem ser 80 a 90% confluentes, devendo-se tomar cuidado para garantir que as células nunca sejam cultivadas até a confluência total. Um dia antes do teste, as células são coletadas e distribuídas em placas de 96 poços, à densidade celular de 10.000 células/poço. Atenção deve ser dada para evitar a sedimentação das células durante a semeadura, para garantir a distribuição homogênea do número de células nos poços. Se não for este o caso, este passo pode dar origem à variabilidade elevada entre os poços. Para cada repetição, três réplicas são usadas para as medições da atividade da luciferase e, pelo menos, uma réplica paralela é usada para o ensaio de viabilidade celular.

Preparação das substâncias químicas e de controle

15. As substâncias químicas em teste e de controle são preparadas no dia do ensaio. As substâncias químicas de teste são dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO, CAS No. 67-68-5, 99% de pureza) até a concentração final desejada (por exemplo, 200mM). As soluções de DMSO podem ser consideradas autoesterilizantes, de modo que nenhuma filtragem estéril é necessária. As substâncias químicas de teste não solúveis em DMSO são dissolvidas em água estéril ou em meio de cultura e as soluções são esterilizadas por filtragem, por exemplo. Para uma substância química que não tenha peso molecular definido (PM), uma solução padrão de estoque é preparada na concentração padrão de 40mg/mL ou 4% (p/v). No caso de solventes que não sejam DMSO, água ou meio de cultura são usados e a justificativa científica apropriada deve ser fornecida.

16. Com base nas soluções de armazenamento da substância química em teste, são feitas diluições em série, utilizando DMSO ou um solvente adequado (água

esterilizada ou meio de cultura) para obter 12 concentrações mestres da substância química a ser testada (de 0,098 a 200mM). Independentemente do solvente utilizado, as concentrações principais são depois diluídas 25 vezes em meio de cultura contendo soro; são então utilizadas para tratamento, com um fator de diluição de 4 vezes, de modo que as concentrações finais da gama química testada variem entre 0,98 e 2.000μM (com base em um fator de diluição de 2). Podem ser utilizadas concentrações alternativas, após justificativa (por exemplo, no caso de citotoxicidade ou fraca solubilidade). Para uma substância química de teste que não tenha PM definido, são feitas diluições em série, usando DMSO ou um solvente adequado, para obter as concentrações finais desejadas da substância química em estudo (por exemplo, 12 concentrações a 0,196 a 400μg/ml).

17. Um solvente/controle de veículo concorrente deve ser testado dentro de cada repetição (DMSO), para o qual deve ser preparado número suficiente de poços por placa (seis). O solvente/veículo controle sofre as mesmas diluições, como descrito para as concentrações mestres no parágrafo 16, de forma que a concentração final do controle solvente/veículo seja de 1%, o que sabidamente não afeta a viabilidade celular e corresponde à mesma concentração de DMSO encontrada na substância química testada e no controle positivo. Para uma substância química não solúvel em DMSO, para a qual as diluições foram feitas em água, o nível de DMSO em todos os poços da solução de teste final deve ser ajustado para 1%, como para as outras substâncias químicas de teste e substâncias de controle. Este controle de solvente/veículo (isto é, DMSO) também representa o controle negativo para o método de teste KeratinoSens™.

18. Um controle positivo concorrente também deve ser testado em número suficiente de poços dentro de cada repetição, conforme descrito no protocolo DB-ALM[9], para demonstrar a resposta apropriada do sistema de teste. Por exemplo, cinco concentrações de aldeído cinâmico (CAS Nº 14371-10-9, $\geq$98% pureza) são usadas dentro de cada réplica, no método de teste KeratinoSens™, para o qual uma série de 5 concentrações mestres variando de 0,4 a 6,4mM são preparadas em DMSO (a partir de uma solução-mãe de 6,4mM). Estas serão diluídas como descrito, para as concentrações mestres no parágrafo 16, de modo que a concentração final do controle positivo varie de 4 a 64μM. Outros controles positivos adequados, preferencialmente fornecendo valores $EC_{1.5}$ na faixa intermediária, podem ser usados se dados históricos estiverem disponíveis para derivar critérios de aceitação de execução comparáveis.

Aplicação das substâncias químicas e de controle de teste

19. Para cada substância química em teste e substância de controle positivo, é necessário um experimento para derivar uma previsão (positiva ou negativa), consistindo em, pelo menos, duas repetições independentes, contendo, cada uma, três réplicas (n=6). No caso de resultados discordantes entre as duas repetições independentes, uma terceira repetição contendo três repetições deve ser realizada (n=9). Cada repetição independente é realizada em um dia diferente com a solução de estoque fresco de substâncias químicas em teste e células coletadas independentemente. As células podem vir da mesma passagem.

20. Após a disseminação, como descrito no parágrafo 14, as células crescem por 24 horas nas placas de microtitulação de 96 poços.

O meio é removido e substituído por meio de cultura fresco (150µl de meio de cultura contendo soro, mas sem geneticina, como descrito no protocolo DB-ALM[9]), ao qual são adicionados 50µl da substância química em teste e da de controle, diluídas 25 vezes. Pelo menos um poço por placa deve ser deixado vazio (sem células e sem tratamento) para avaliar os valores de fundo.

21. As placas tratadas são então incubadas durante cerca de 48 horas, a 37 ± 1°C na presença de 5% de CO_2. Deve-se ter cuidado para evitar a evaporação de substâncias químicas em teste voláteis e a contaminação cruzada entre poços por substâncias químicas de teste, por exemplo, cobrindo as placas com uma folha durante a incubação com as substâncias químicas em teste.

Medidas de atividade da luciferase

22. Os seguintes fatores são críticos para assegurar leituras de luminescência apropriadas:

- A escolha de um luminômetro sensível
- A utilização de um formato de placa com altura suficiente para evitar a contaminação de luz cruzada
- O uso de um substrato de luciferase com saída de luz suficiente para assegurar sensibilidade e baixa variabilidade
- Um nível de fundo adequado e estável

Antes do teste, um experimento de controle, configurado como descrito no anexo 3 deste Apêndice, deve ser realizado para garantir que esses pontos sejam atendidos.

23. Após o período de exposição de 48 horas com a substância química em teste e as substâncias de controle, as células são lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato e com o tampão de lise, relevante para leituras de luminescência, adicionado a cada poço durante tempo suficiente (por exemplo, 20 min à temperatura ambiente).

24. As placas com o lisado celular são então colocadas no luminômetro para leitura, que é programado para: (i) adicionar o substrato da luciferase a cada poço (ou seja, 50µl), (ii) aguardar 1 segundo e (iii) integrar a atividade da luciferase por 2 segundos. No caso de serem usadas configurações alternativas, por exemplo, dependendo do modelo de luminômetro utilizado, estes devem ser justificados.

Além disso, pode também ser utilizado um substrato luminoso, desde que a experiência de controle de qualidade do anexo 3 do presente apêndice seja preenchida com êxito.

Avaliação de citotoxicidade

25. Para o ensaio de viabilidade celular KeratinoSens™, o meio é substituído após 48 horas de exposição com meio fresco, contendo 5mg/ml de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio, tiazolilo), brometo de tetrazólio azul, CAS Nº 298-93-1) e as células são incubadas durante 4 horas a 37 ± 1°C na presença de 5% de CO_2. O meio MTT é então removido e as células são lisadas, utilizando um agente de lise apropriado durante período de tempo suficiente (por exemplo, SDS a 10% durante a noite). Após agitação, a absorção é então medida a 600nm, por exemplo, com um fotômetro – como descrito nos protocolos do método de teste[9].

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação de dados

26. Os seguintes parâmetros são calculados no método de teste KeratinoSens™:

- A indução média máxima da atividade da luciferase (I_{max}) observada em qualquer concentração da substância química em teste e de controle

- O valor de $EC_{1.5}$, representando a concentração para a qual foi obtida uma indução de atividade de luciferase acima do limiar de 1,5 vezes (50% de atividade de luciferase aumentada)
- vvOs valores de concentração de IC_{50} e IC_{30} para os quais ocorrem 50% e 30% de redução da viabilidade celular, respectivamente

A indução da atividade de luciferase dobrada é calculada pela Equação 1 e pela indução geral duplicada máxima (I_{MAX}), calculada pela média das repetições individuais.

Equação 1:
$$\textit{Indução replicada} = \frac{(L_{\text{amostra}} - L_{\text{vazio}})}{(L_{\text{solvente}} - L_{\text{vazio}})}$$

Onde:

L_{amostra} é a leitura da luminescência no poço da substância química.

L_{vazio} é a leitura de luminescência no poço vazio que não contém nenhuma célula e nenhum tratamento.

$L_{\text{solventes}}$ é a leitura média de luminescência nos poços que contêm células e solvente de controle (negativo).

$EC_{1.5}$ é calculado por interpolação linear, de acordo com a Equação 2, e o EC1.5 é calculado como a média geométrica das repetições individuais.

Equação 2:
$$EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \frac{(1.5 - I_a)}{(I_b - I_a)} + C_a$$

Onde:

C_a é a concentração mais baixa em μM com duplicação de indução >1.5.

C_b é a concentração mais alta em μM com duplicação de indução <1.5.

I_a é a duplicação da indução medida na menor concentração com duplicação de indução >1.5 (média dos 3 poços de replicação).

I_b é a duplicação da indução na concentração mais alta com duplicação de indução <1.5 (média dos 3 poços de replicação).

Viabilidade é calculada pela equação 3:

Equação 3:
$$Viabilidade = \frac{(V_{amostra} - V_{vazio})}{(V_{solvente} - V_{vazio})} \times 100$$

Onde:

$V_{amostra}$ é a leitura de absorbância MTT no poço da substância química em teste.

V_{vazio} é a leitura de absorbância no poço vazio que não contém células e sem tratamento.

$V_{solução}$ é a leitura de absorbância média nos poços contendo células e controle de solvente (negativo).

IC_{50} e IC_{30} são calculados por interpolação linear, de acordo com a Equação 4; o IC_{50} e o IC_{30} gerais são calculados pela média geométrica das repetições individuais.

Equação 4;
$$IC_X - (C_b - C_a) \times \frac{\left((100-_X) - V_a\right)}{(V_b - V_a)} + C_a$$

Onde:

X é a % de redução na concentração a ser calculada (50 e 30 para IC_{50} e IC_{30}).

C_a é a menor concentração em μM com >x% de redução na viabilidade.

C_b é a maior concentração em μM com <x% de redução na viabilidade.

V_a é a % de viabilidade na menor concentração com >x% de redução na viabilidade.

V_b é a% de viabilidade na maior concentração com <x% de redução na viabilidade.

27. Para cada concentração mostrando uma indução de atividade de luciferase ≥ a 1,5 vez, é determinada a significância estatística (por exemplo, utilizando um teste t de Student bicaudal), comparando os valores de luminescência das três amostras replicadas com os valores de luminescência nos poços de controle solvente/veículo, para avaliar se a indução da atividade da luciferase é estatisticamente

significativa ($p<0,05$). Todavia, deve ser verificado se não ocorrem efeitos citotóxicos significativos na concentração mais baixa, levando à indução de luciferase $>1,5$ fator e se esta concentração está abaixo do valor de IC_{30}, indicando que há redução $\leq$ 30% na viabilidade celular. Entretanto, pelo menos duas concentrações consecutivas devem ter $>70\%$ de viabilidade, caso contrário o intervalo da concentração deve ser ajustado.

28. Recomenda-se que os dados sejam verificados visualmente com a ajuda de gráficos. Se não for observada uma curva dose-resposta clara ou se a curva dose-resposta obtida for bifásica (ou seja, cruzar o limiar de 1,5 por duas vezes), a experiência deve ser repetida, para verificar se é específica da substância química em estudo ou do artefato.

No caso de a resposta bifásica ser reprodutível numa experiência independente, a menor concentração deve ser relatada quando o limiar de 1,5 é cruzado pela a primeira vez.

29. No método de teste KeratinoSens™, nos raros casos em que se observa uma indução de luciferase estatisticamente não significativa igual ou superior a 1,5 vez, seguida de concentração mais elevada, com uma indução estatisticamente significativa, os resultados desta repetição só são considerados válidos e positivo se for obtida uma indução estatisticamente significativa igual ou acima do limiar de 1,5 para a concentração não citotóxica.

30. Finalmente, para substâncias químicas em teste, que geram uma indução de fator de 1,5 ou mais, já na concentração mais baixa (0,98μM) no método de teste KeratinoSens™, o valor $EC_{1,5}$ de $<0,98$ é definido com base na inspeção visual da curva de dose-resposta.

Critérios de aceitação

31. Os seguintes critérios de aceitação devem ser atendidos ao se usar o método de teste KeratinoSens™:

- A indução da atividade da luciferase, obtida com o controle positivo, o aldeído cinâmico, deve ser estatisticamente significativa, acima do limiar de 1,5 (por exemplo, usando um teste t) em, pelo menos, uma das concentrações testadas (4 a 64μM).
- O valor $EC_{1.5}$ do controle positivo deve estar dentro de dois desvios padrão

da média histórica da instalação de teste (por exemplo, entre 7μM e 30μM, com base no conjunto de dados de validação), que deve ser atualizado regularmente. Com isso, a indução média nas três repetições, para o aldeído cinâmico a 64μM, deve ser entre 2 e 8. Se este último critério não for cumprido, a dose-resposta do aldeído cinâmico deve ser cuidadosamente verificada e os testes podem ser aceitos apenas se há uma dose-resposta clara com o aumento da indução da atividade da luciferase em concentrações crescentes para o controle positivo.

- O coeficiente médio de variação da leitura de luminescência para o controle de solvente/veículo (DMSO) deve ser inferior a 20% em cada repetição. Se a variabilidade for maior, os resultados devem ser descartados.

Interpretação de resultados e modelo de previsão

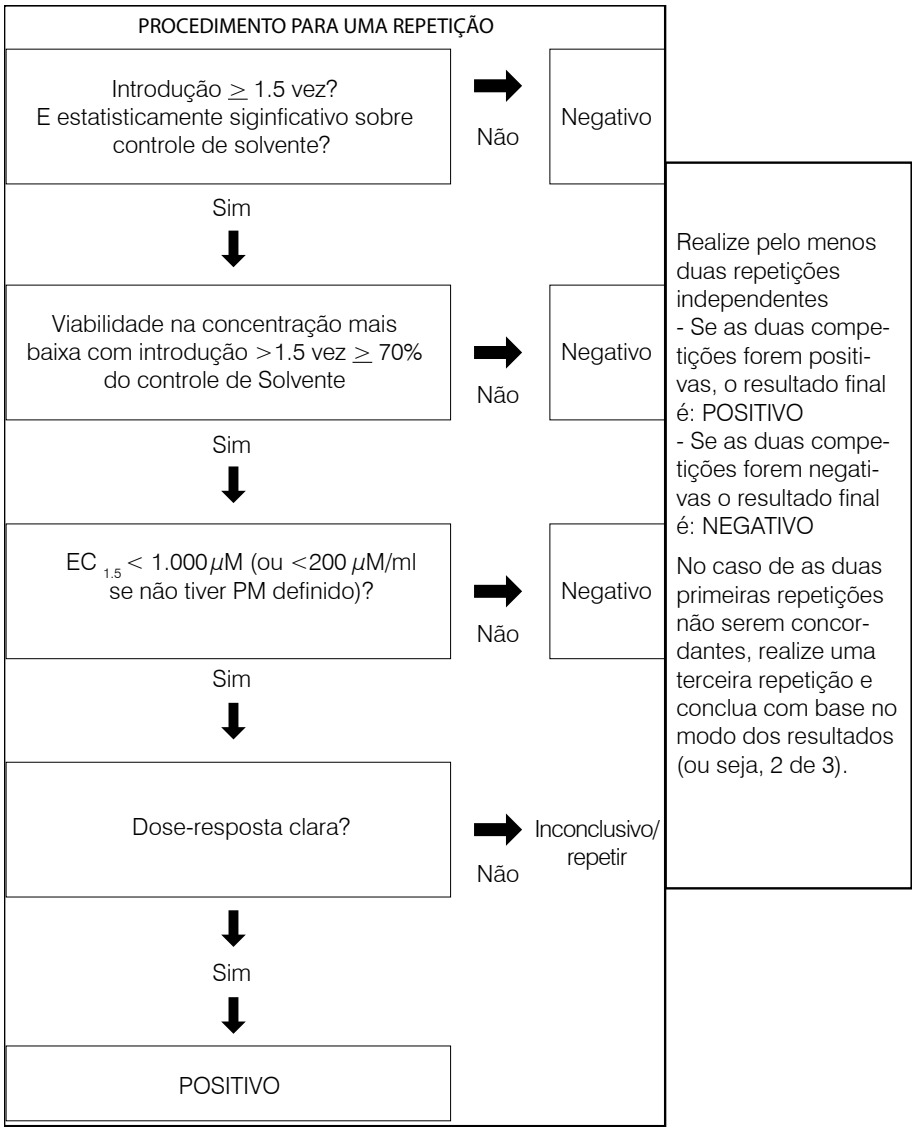
32. Uma previsão de KeratinoSens™ é considerada positiva se as 4 condições seguintes forem cumpridas: 2 em cada 2, nas mesmas condições, ou 2 de 3 repetições. Caso contrário, a previsão de KeratinoSens™ é considerada negativa (figura 1):

- O I_{max} é igual ou superior a fator($\geq$) 1,5 e estatisticamente significativo, diferente em comparação com o controle de solvente/veículo (conforme determinado por um teste t-Student bicaudal não pareado).
- A viabilidade celular é $>$ 70% na concentração mais baixa, com indução da atividade da luciferase $\geq$1,5 fator (na concentração determinante de $EC_{1,5}$).
- O valor de $EC_{1,5}$ é $<$ 1.000μM (ou $<$200μg/mL, para substâncias químicas de teste sem PM definidos).
- Existe um aumento dependente da dose na indução da luciferase (ou uma resposta bifásica, como mencionado no parágrafo 28).

Se, em uma dada repetição, todas as três primeiras condições forem satisfeitas, mas um aumento claro e dependente da dose na indução da luciferase não puder ser observado, então o resultado dessa repetição deve ser considerado inconclusivo e testes adicionais podem ser necessários (figura 1). Contudo, um resultado negativo, obtido com substâncias químicas testadas em concentração máxima de teste $<$1.000μM (ou 200μg/mL, para substâncias químicas sem PM definidos) e que não atingem citotoxicidade ($<$70% de viabilidade), na concentração máxima testada, também deve ser considerado inconclusivo (ver parágrafo 4).

Figura 1. Modelo de previsão usado no método de teste KeratinoSens™.

Uma previsão KeratinoSens™ deve ser considerada no âmbito de uma abordagem definida ou de uma AITA e de acordo com o disposto nos parágrafos 7 e 8 da introdução geral.



33. Nos casos em que substâncias químicas em teste induzem a atividade da luciferase muito próxima dos níveis citotóxicos, elas podem ser positivas em algumas repetições, em níveis não citotóxicos ($EC_{1.5}$ determinando concentração abaixo (<) da IC_{30}), e em outras repetições, apenas em níveis citotóxicos ($EC_{1.5}$ determinando a concentração acima (>) do IC_{30}).

Estas substâncias químicas de teste devem ser retestadas com análises de resposta à dose mais estreitas usando-se um fator de diluição mais baixo (por exemplo: 1,33 ou $\sqrt{2}$(=1,41) vezes de diluição entre poços), para determinar se a indução ocorreu em níveis citotóxicos ou não[3].

Relatório de teste

34. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

Substância Química

Substância monoconstituinte:

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores, como número de lote e data de validade
- Aspecto físico, solubilidade em água, solubilidade em DMSO, peso molecular e propriedades físico-químicas relevantes adicionais, na medida do disponível
- Declaração sobre (in)solubilidade ou dispersão estável em meios de exposição
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente viável, etc.
- Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
- Concentração(ões) testada(s)
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível

Substância multiconstituinte, UVCB e mistura:

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, identidade química (ver acima), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver acima) dos constituintes, na medida em que estejam disponíveis
- Aspecto físico, solubilidade em água, solubilidade em DMSO e propriedades físico-químicas adicionais relevantes, na medida do possível

- Peso molecular ou peso molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas ou outras informações relevantes para a condução do estudo
- Declaração sobre (in)solubilidade ou dispersão estável em meios de exposição
- O tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
- Concentração(ões) testada(s)
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível

Controles

Controle positivo:

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS, Código SMILES ou InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores
- Aspecto físico, solubilidade em água, solubilidade em DMSO, peso molecular e propriedades físico-químicas adicionais relevantes, na medida do possível e quando aplicável
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente praticável, etc.
- Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
- Concentração(ões) testada(s)
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
- Referência a resultados históricos de controle positivo que demonstrem critérios de aceitação de execução adequados, se aplicável

Solvente/veículo/controle negativo:

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS, e/ou outros identificadores
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente praticável, etc.
- Aspecto físico, peso molecular e propriedades físico-químicas adicionais relevantes, no caso de outros solventes/veículos/controles negativos diferentes dos mencionados no presente Apêndice e na medida em que estejam disponíveis

- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
- Justificação para a escolha do solvente/veículo para cada substância química em estudo

Condições do método de teste

- Nome e endereço do patrocinador, instalação de teste e diretor de estudo
- Descrição do método de teste utilizado
- Linha celular usada, suas condições de armazenamento e fonte (por exemplo, a facilidade da qual foram obtidas)
- Número de passagens e nível de confluência das células utilizadas para teste
- Método de contagem de células usado para semear antes dos testes e medidas tomadas para assegurar a distribuição homogênea do número de células (ver parágrafo 14)
- Luminômetro usado (por exemplo, modelo), incluindo configurações do instrumento, substrato de luciferase usado e demonstração de medidas de luminescência apropriadas, com base no teste de controle descrito no anexo 3 deste Anexo
- O procedimento usado para demonstrar a proficiência do laboratório na execução do método de teste (por exemplo, através do teste de substâncias de proficiência) ou para demonstrar o desempenho reproduzível do método de teste ao longo do tempo

Procedimento de teste

- Número de repetições e réplicas usadas
- Testes das concentrações químicas, procedimento de aplicação e tempo de exposição usados de modo diferente ao recomendado
- Descrição dos critérios de avaliação e decisão utilizados
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados
- Descrição de quaisquer modificações do procedimento de teste

Resultados

- Tabulação dos valores de I_{max}, $EC_{1.5}$ e viabilidade (IC_{50}, IC_{30}) obtidos para o teste químico e para o controle positivo, para cada repetição, bem como dos valores médios (I_{max}: média; $EC_{1.5}$ e valores de viabilidade: média geométrica) e SD

calculados usando dados de todas as repetições individuais e uma indicação da classificação do teste químico, de acordo com o modelo de previsão

- Coeficiente de variação obtido com as leituras de luminescência para o solvente/veículo/controle negativo para cada experimento
- Um gráfico representando as curvas dose-resposta para indução da atividade e viabilidade da luciferase
- Descrição de quaisquer outras observações relevantes, se aplicável

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o método de teste KeratinoSens™
- Consideração dos resultados do método de teste, no contexto de um AITA, se outras informações relevantes estiverem disponíveis

Conclusão

LITERATURA

1) 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. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

2) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

3) Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

4) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

5) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1, 45-49.

6) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter- laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

7) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology 33, 1337-1352.

8) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam- recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

9) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSensTM., 17 pp. Available: [http://ecvam- dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

10) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

11) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J. Appl. Toxicol. 33, 1353-1364.

12) Casati S., Aschberger K., Asturiol D., Basketter D., Dimitrov S., Dumont C., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P., Patlewicz G., Roberts D.W., Worth A. (2016). Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. EUR 27752 EN. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl- ecvam-status-reports/pre-prohapten-workshop-report.

13) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

14) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing Nº 457. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

15) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to poten-

cy. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report Nº 87).

16) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze 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.

17) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

18) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

19) Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P.S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul. Toxicol. Pharmacol. 71, 337-351.

20) Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S.N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016). Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Non-animal Test Methods for Skin Sensitization. Chem. Res. Toxicol. 29, 901-13.

21) Natsch A, Emter R, Gfeller H, Haupt T, Ellis G (2015). Predicting Skin Sensitizer Potency Based on *In Vitro* Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. Toxicol Sci 143, 319-332.

22) 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.

23) Strickland J, Zang Q, Paris M, Lehmann DM, Allen D, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Casey W, Kleinstreuer N (2017). Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard. J Appl Toxicol 37, 347-360.

24) Delaine T, Ponting DJ, Niklasson IB, Emter R, Hagvall L, Norrby PO, Natsch

A, Luthman K, Karlberg AT (2014). Epoxyalcohols: bioactivation and conjugation required for skin sensitization. Chem Res Toxicol 27, 1860-1870.

25) Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. Arch. Biochem. Biophys. 344, 387-396.

26) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol. 126, 1813-1822.

27) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I. And Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

28) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSensTM cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *In Vitro* 27, 2225-2232.

29) OECD (2015). Guidance Document Nº 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-NrF2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing- assessment-publications-number.htm

30) 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]

31) Basketter D.A., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinozzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. Dermatitis 25, 11-21.

32) Belot N, Sim B, Longmore CL, Roscoe L, Treasure C. (2017) Adaptation of the KeratinoSensTM skin sensitisation test to animal-product-free cell culture.ALTEX. 2017 Mar 16. doi: 10.14573/altex.1701311.

33) 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.

APÊNDICE IA - ANEXO 1: substâncias de proficiência

Sensibilização cutânea in vitro:

O método de teste ARE-Nrf2 Luciferase KeratinoSens™

Antes do uso rotineiro de um método de teste, que atenda a este Apêndice da Diretriz de Teste 442D, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, obtendo corretamente a predição prevista de KeratinoSens™ para as 10 Substâncias de Proficiência, recomendadas na tabela 1, e obtendo os valores $EC^{1.5}$ e IC^{50} que estão dentro do respectivo intervalo de referência para, pelo menos, 8 das 10 substâncias de proficiência. Estas substâncias de proficiência foram selecionadas para representar a faixa de respostas para os riscos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção foram disponibilidade comercial, disponibilidade de referência *in vivo* de alta qualidade e disponibilidade de dados *in vitro* de alta qualidade do método de teste KeratinoSens™.

Tabela 1. Substâncias recomendadas para demonstrar proficiência técnica com o método de teste KeratinoSens™

Substância de proficiência	CARSRN	Estado físico	Previsão LLNA[1]	Categoria humana[2]	Previsão de Keratino-Sens™ [3]	Faixa de referência do $EC_{1.5}$ (μM) [4]	Faixa de referência do $IC_{1.5}$ (μM)
Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	Não sensibilizador	Cat. 6	Negativo	> 1.000	> 1.001
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	Não sensibilizador	Cat. 6	Negativo	> 1.000	> 1.001
Glicerol	56-81-5	Líquido	Não sensibilizador	Cat. 6	Negativo	> 1.000	> 1.000

Substância de proficiência	CARSRN	Estado físico	Previsão LLNA[1]	Categoria humana[2]	Previsão de Keratino-Sens™ [3]	Faixa de referência do $EC_{1.5}$ (μM) [4]	Faixa de referência do $IC_{1.5}$ (μM)
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Não sensibilizador	Cat. 5	Negativo	> 1.000	> 1.000
Dimetacrilato de etileno	97-90-5	Sólido	Sensibilizador (fraco)	Cat. 4	Positivo	5-125	>500
Álcool cinamílico	104-54-1	Sólido	Sensibilizador (fraco)	Cat. 3	Positivo	25-175	> 1.000
2- Mercapto-benzotiazol	149-30-4	Sólido	Sensibilizador (moderado)	Cat. 3	Positivo	25-250	>500
Sulfato de 4-metilaminofenol	55-55-0	Sólido	Sensibilizador (forte)	Cat. 3	Positivo	<12.5	20-200
Metildibromo glutaronitrilo	35691-65-7	Sólido	Sensibilizador (forte)	Cat. 2	Positivo	<20	20-100
2,4-dinitro--cloroben-zeno	97-00-7	Sólido	Sensibilizador (extremo)	Cat. 1	Positivo	<12.5	mai/20

Notas: 1) As previsões de risco (e potência*) in vivo* são baseadas em dados de LLNA[7]. A potência *in vivo* é derivada usando-se os critérios propostos pelo ECETOC[15]. 2) Segundo Basketter e colaboradores[32], Cat. 1 representa evidência clara de alergia de contato, Cat. 2 uma causa frequente de alergia de contato, Cat. 3 uma causa comum de alergia de contato, Cat. 4 uma causa infrequente de alergia de contato, Cat. 5 uma causa rara de alergia de contato e Cat. 6 evidência essencialmente ausente de alergia de contato[32]. 3) Uma previsão KeratinoSens™ deve ser considerada no âmbito de um Método Definido ou de um AITA e de acordo com as disposições dos parágrafos 7 e 8 da introdução geral. 4) Baseado nos valores históricos observados[6].

APÊNDICE IA - ANEXO 2: adaptação do método de teste de keratinoskin^{tm} usando reagentes humanos para alcançar cultura de células livre de xeno

A seguinte adaptação ao método de teste KeratinoSens™ pode ser realizada usando-se reagentes humanos (soro humano e tripsina humana recombinante) para obter cultura celular livre de xeno, sujeita à demonstração de proficiência técnica (conforme descrito no anexo 1) usando-se o método adaptado[33].

Tabela 2. Resumo das adaptações

Aspecto do Método	Método de Referência Validado (KeratinoSens™) (Anexo 1A)	Adaptação Xeno-Livre (este Anexo)
Soro[1]	Estabelece "soro" (protocolo DB-ALM 155 estabelece soto fetal bovino) (parágrafo 13)	Específica 10% de soro humano
Medida da Citotoxicidade [2]	MTT: 4 horas de incubação; solubilizar em 10% de MTT: 4 h de incubação; solubilizar em 10% (parágrafo 25)	MTT (1mg / ml): 3 horas de incubação; solubilizar em isopropanol; ler em 570nm
Controle Positivo [2]	Aldeído Cinâmico 4-64μM (parágrafo 18)	Aldeído Cinâmico 8-128μM.
Tripsina[1]	Não especificado (o protocolo DB-ALM 155 declara o Trypsin EDTA)	Tripsina recombinante não animal (TrypZean, Sigma-Aldrich T3499)

Nota: [1] Adaptações para alcançar condições livres de xeno; [2] Outras adaptações ao método[33].

Antes de usar para fins de teste, a linha celular KeratinoSens™ deve ser adaptada à cultura de rotina, usando-se soro humano a 10%. O soro humano (de doadores agrupados) deve ser obtido a partir de uma fonte comercial confiável, com consentimento apropriado do doador e teste de CQ para aplicações de cultura celular. Como com qualquer tipo de soro, quando um novo lote é usado, uma validação interna do lote, incluindo morfologia celular, taxas de crescimento e valores I_{max} / $EC_{1.5}$ com, pelo menos, o controle positivo, e preferencialmente substâncias químicas de referência representativas (pelo menos um sensibilizador e um não sensibilizador), deve ser realizada, com subsequente reserva de lotes bem-sucedidos para uso a longo prazo. Se as células foram previamente cultivadas em soro

fetal de vitelo, elas devem ser desmamadas no soro humano por, pelo menos, 3 passagens. Desde que as células apresentem morfologia saudável e taxas de crescimento comparáveis com as do soro fetal de vitelo, um banco de células deve ser criado para uso futuro.

Deve-se observar que a linhagem KeratinoSens™, quando cultivada em soro humano, deve ser cultivada até número máximo de 22 passagens, para o ótimo desempenho, incluindo o número necessário para adaptá-las ao soro humano. Para alcançar uma cultura celular totalmente livre de xeno, deve-se usar uma fonte não animal de tripsina recombinante (por exemplo, Trypzean™) para coletar as células durante a subcultura[33]. Em todos os outros aspectos, as células devem ser cultivadas da mesma maneira descrita neste Apêndice à Diretriz de Teste 442D e ao protocolo DB-ALM[9], para a linha de células KeratinoSens™ de referência.

Com referência ao parágrafo 18, a adaptação livre de xeno do método de teste KeratinoSens™ utilizando reagentes humanos foi otimizada usando-se aldeído cinâmico (CAS Nº 14371-10-9, >98% de pureza) como controle positivo, em uma faixa de concentração final de 8 a 128μM. Outros controles positivos, preferencialmente fornecendo valores de $EC_{1.5}$ na faixa intermediária, podem ser usados, se dados históricos estiverem disponíveis para derivar critérios de aceitação de execução comparáveis[33].

Com referência ao parágrafo 25, a adaptação livre de xeno do método de teste KeratinoSens™ utilizando reagentes humanos foi otimizada usando-se o seguinte método para avaliação de citotoxicidade.

O meio é substituído após 48 horas de exposição com meio fresco contendo MTT (brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio; CAS Nº 298-93-1), na concentração de 1mg/ml, e células incubadas durante 3 horas a 37 ± 1°C, na presença de 5% de CO_2. O meio MTT é então removido e as células são solubilizadas pela adição de isopropanol. Após agitação durante 30 minutos, a absorção é medida a 570nm com um espectrofotômetro.

Em todos os outros aspectos, a adaptação livre de xeno do método de teste KeratinoSens™ usando-se reagentes humanos deve ser conduzida da mesma maneira descrita para o método padrão exposto neste Apêndice à Diretriz de Teste 442D e ao protocolo DB-ALM[9] para a linha celular de referência KeratinoSens™.

APÊNDICE IA - ANEXO 3: controle de qualidade das medições de luminescência

Experiência básica para garantir ótimas medições de luminescência no método de teste KeratinoSens™

Os três parâmetros a seguir são críticos para garantir a obtenção de resultados confiáveis com o luminômetro:

- Ter sensibilidade suficiente, proporcionando fundo estável nos poços de controle
- Não ter gradiente sobre a placa devido a longos tempos de leitura
- Nenhuma contaminação leve nos poços adjacentes dos poços fortemente ativos

Antes de testar, recomenda-se assegurar medições de luminescência apropriadas, testando uma configuração de placa de controle como descrito abaixo (análise triplicada).

Tabela 1. Configuração da placa do primeiro experimento de treinamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0.98	EGDMA 1.95	EGDMA 3.9	EGDMA 7.8	EGDMA 15.6	EGDMA 31.25	EGDMA 62.5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1.000	EGDMA 2.000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	EM BRANCO

Notas: EGDMA = dimetacrilato de etilenoglicol (CAS Nº 97-90-5), um composto fortemente indutor. C = aldeído cinâmico, referência positiva (Nº CAS: 104-55-2). Concentrações são dadas em μM.

A análise de controle de qualidade deve demonstrar:

- Um aumento dependente da dose na indução da luciferase na linha D, com o I_{max} >20 vezes acima do fundo (na maioria dos casos, os valores I_{max} entre 100 e 300 são atingidos)

- Um aumento dependente da dose na indução de luciferase nos poços H7 a H11, com uma indução de fator de 2 a 8 nos poços H11
- Nenhum aumento dependente da dose na indução da luciferase nas linhas C e E (nenhum valor de indução igual ou acima de 1,5 – idealmente, não acima de 1,3) devido à possível contaminação leve, especialmente próximo a poços fortemente ativos na linhagem EGDMA
- Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as linhas A, B, C, E, F e G (ou seja, sem gradiente sobre placa)
- A variabilidade em qualquer uma das linhas A, B, C, E, F e G e nos poços DMSO na linha H deve ser inferior a 20% (fundo estável)

APÊNDICE IB: SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*:

O teste ARE-Nrf2 Luciferase LuSens

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

1. O método de teste, descrito neste Apêndice da Diretriz de Teste 442D, aborda o segundo evento-chave da VEA da sensibilização cutânea[1] – ativação de queratinócitos – avaliando a ativação mediada por Nrf2 do elemento de resposta antioxidante (RAE) – gene dependentes, com a ajuda da luciferase. Tem sido relatado que os sensibilizadores cutâneos induzem genes que são regulados pela ARE[2-3]. Pequenas substâncias eletrofílicas, tais como sensibilizadores cutâneos, podem atuar na proteína sensor Keap1 do sensor (proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch), pela modificação covalente do seu resíduo de cisteína, resultando na sua dissociação do fator de transcrição Nrf2 (fator 2 relacionado com fator nuclear-eritroide 2). O Nrf2 dissociado pode então ativar genes dependentes de ARE, tais como aqueles que codificam enzimas desintoxicantes de fase II[2;4-5].

2. O método de ensaio *in vivo* ARE-Nrf2 luciferase LuSens (a seguir denominado método do teste LuSens) foi submetido a um estudo de validação baseado no Padrão de Desempenho, apoiado no Método de Referência Validado KeratinoSens™ (MRV)[6-9], seguido de uma análise independente pelos pares, conduzida pelo Laboratório de Referência da União Europeia para Alternativas aos Ensaios em Animais (EURL ECVAM)[10]. O método do teste LuSens foi considerado cientificamente válido para ser usado como parte de um AITA, para apoiar a discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores cutâneos para fins de identificação de riscos[10].

3. O método de teste LuSens provou ser transferível para laboratórios experientes em técnicas de cultura celular e cumpriu os padrões de desempenho de reprodutibilidade exigidos dentro e entre laboratórios[10]. Informações adicionais de um estudo interno anterior sobre 72 substâncias químicas testadas mostraram capacidade preditiva similar à da MRV (74% de precisão, 74% de sensibilidade e 74% de especificidade) para discriminar sensibilizadores cutâneos (Cat. 1 da GHS) de não sensibilizadores, em comparação com resultados LLNA[7;10], indicando a utilidade do método de teste LuSens para contribuir para a identificação do risco de sensibilização cutânea. No entanto, os valores de exatidão fornecidos aqui, para o método de teste LuSens – como um método de teste independente, são apenas indicativos, pois o método de teste deve ser considerado em combinação com outras fontes de informação, no contexto de uma Abordagem Definida ou AITA e de acordo com as disposições dos parágrafos 7 e 8 na Introdução Geral desta Diretriz. Entretanto, ao avaliar métodos não animais para a sensibilização cutânea, deve-se ter em mente que o teste LLNA, bem como outros testes em animais, podem não refletir totalmente a situação em humanos.

4. Com base nos dados atuais disponíveis, o método de teste LuSens mostrou-se aplicável a substâncias químicas em teste, abrangendo uma variedade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potência de sensibilização cutânea (conforme determinado com estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas[7-8]. O método de ensaio é aplicável em teste com substâncias químicas solúveis ou que formam uma dispersão estável no meio de exposição (isto é, um coloide ou uma suspensão em que a substância química em teste não se assenta ou se separa do solvente em diferentes fases). As substâncias químicas em teste que não preenchem estas condições na concentração de teste final mais alta (2.000μM ou 2.000μg/mL, se não houver peso molecular disponível) ainda podem ser testadas em concentrações mais baixas. Nesse caso, os resultados que preenchem os critérios de positividade podem ainda ser usados para apoiar a identificação da substância química em teste como um sensibilizante cutâneo. Nos casos em que um resultado negativo é obtido em um teste com concentrações $<$2.000μM (ou $<$2.000μg/mL, se não houver peso molecular disponível) e nenhuma citotoxicidade for observada, o resultado deve ser considerado inconclusivo (ver modelo de previsão no parágrafo 32).

Se a citotoxicidade ($<$70% de viabilidade) for atingida em concentração de teste $<$2.000μM (ou $<$2.000μg/mL, se não houver peso molecular disponível), critérios para negatividade ainda podem ser aplicados. Em geral, substâncias monoconsti-

tuintes, com um LogP acima de 7, podem ser insolúveis no meio de exposição; no entanto, se a solubilidade ou a dispersão estável puder ser obtida e documentada, o teste pode ainda ser conduzido.

5. Os resultados negativos devem ser interpretados com cautela, pois substâncias com reatividade exclusiva, em relação aos resíduos de lisina, podem ser detectadas como negativas pelo método de teste, dado que o mecanismo chave que leva à ativação da via Keap1-Nrf2-ARE parece ser a reação eletrofílica de estressores com tióis nucleofílicos (grupos cisteína sulfidrila) de Keap-1. A informação complementar dos ensaios de reatividade de peptídeos pode ajudar a resolver esta incerteza, particularmente os ensaios capazes de distinguir entre reatividade de cisteína e lisina. Contudo, devido à limitada capacidade metabólica da linhagem celular utilizada[12] e devido às condições experimentais, pró-haptenos (substâncias químicas que requerem ativação enzimática, por exemplo, via enzimas P450) e pré-haptenos (químicos ativados pela auto-oxidação), em particular, com taxa de oxidação lenta, também podem fornecer resultados negativos. No entanto, foi demonstrado que, em sua maioria, os pré-haptenos e os pró-haptenos são suficientemente bem identificados por uma combinação de métodos de teste de eventos 1, 2 e 3 no VEA, de modo que os resultados negativos podem, em geral, ser usados para apoiar a classificação[13-15]. Por outro lado, as substâncias químicas em teste que não atuam como sensibilizantes, mas que, no entanto, são estressoras químicas, podem levar a resultados falso positivos, como mostrado no MRV [11]. Finalmente, substâncias químicas em teste que interferem com a enzima luciferase podem confundir a atividade desta enzima em ensaios baseados em células, causando inibição aparente ou aumento da luminescência[16]. Por exemplo, concentrações de fitoestrógenos superiores a 1μM foram relatadas como interferindo nos sinais de luminescência em outros ensaios do gene repórter baseados em luciferase, devido à superativação do gene repórter de luciferase[17]. Como consequência, a expressão de luciferase obtida em altas concentrações de fitoestrogênios ou compostos similares, suspeitos de produzir superativação do gene repórter da luciferase, como o fitoestrógeno, precisa ser cuidadosamente examinada[17]. Nos casos em que as provas possam ser demonstradas quanto a não aplicabilidade do método de ensaio LuSens a outras categorias específicas de substâncias químicas de ensaio, este método de ensaio não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

6. Além de apoiar a discriminação entre sensibilizadores cutâneos (Categoria 1 da GHS) e não sensibilizadores, o método de teste LuSens também fornece informação (por exemplo, dose-resposta) que pode contribuir potencialmente para a avaliação da potência sensibilizante, quando usada em abordagens integradas

como o AITA, tal como descrito para o MRV [13]. No entanto, mais trabalhos, preferencialmente baseados em dados humanos, são necessários para determinar como os resultados do método de teste de LuSens podem contribuir para a avaliação de potência, especialmente no contexto de um AITA[18]. Exemplos de como usar os métodos do teste de luciferase ARE-Nrf2, em combinação com outras informações, são relatados na literatura[15;18].

7. As definições são fornecidas no anexo 1 da Introdução Geral.

PRINCÍPIO DO TESTE

8. O método de teste LuSens faz uso de uma linhagem celular aderente, imortalizada e derivada de queratinócitos humanos que abrigam, de forma estável, um gene repórter de luciferase, sob o controle do elemento de resposta antioxidante do gene NQO1 de camundongo[20]. Sabe-se que os genes dependentes da ARE, como o NQO1, são regulados positivamente pelos sensibilizadores de contato[21-22]. A linhagem celular contém o gene da luciferase sob o controle transcricional de um promotor fundido com o elemento ARE[7]. O sinal da luciferase reflete a ativação por sensibilizadores de genes dependentes de Nrf2 endógenos, enquanto a dependência do sinal da luciferase na linhagem celular recombinante em Nrf2 foi demonstrada, diretamente, para o MRV[23] e, indiretamente, para o LuSens[7]. Isto permite a medição quantitativa (por detecção de luminescência) da indução do gene da luciferase, utilizando substratos produtores de luz bem estabelecidos, como um indicador da atividade do fator de transcrição Nrf2 em células, após a exposição a substâncias de teste eletrofílicas.

9. Testes químicos são considerados positivos no método de teste LuSens se estimularem estatisticamente a atividade da luciferase acima de um determinado limiar (≥1,5 vezes, ou 50% de aumento) em, pelo menos, duas concentrações consecutivas que não afetem significativamente a viabilidade da célula (em que a viabilidade celular é superior a 70%)[7-8]. Para este propósito, a indução da atividade da luciferase sobre o controle do solvente/veículo é determinada. Além disso, medições paralelas de citotoxicidade devem ser realizadas, para avaliar se os níveis de indução da atividade da luciferase ocorrem em concentrações subcitotóxicas.

10. Antes do uso rotineiro do método de teste LuSens que esteja em conformidade com este Diretriz de Teste, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, usando as dez Substâncias de Proficiência listadas no anexo 1 deste Apêndice.

PROCEDIMENTO

11. Um protocolo DB-ALM para o método de teste LuSens está disponível e deve ser empregado ao se implementar e se usar o método de teste no laboratório[24]. Um resumo das principais etapas do protocolo do método de teste LuSens, em comparação com o MRV, é dado no anexo 2 deste suplemento. Os laboratórios que implementam esta Diretriz de Teste podem obter a linhagem de células recombinantes usada no método de teste por meio de solicitações aos desenvolvedores de testes[3]. O ensaio do gene repórter da luciferase está sujeito à licença de uso limitado da Promega, exigindo: i) o uso de reagentes de ensaio luminescentes adquiridos da Promega ou ii) entrar em contato com a Promega para obter uma licença livre para uso comercial. Os parágrafos seguintes fornecem uma descrição dos principais componentes e procedimentos do método de teste LuSens.

Preparação das culturas de queratinócitos

12. Deve ser utilizada a linhagem celular transgênica LuSens, com uma inserção estável do gene repórter da luciferase sob o controle do elemento ARE. Após a recepção, as células são propagadas, como definido pelo protocolo do método de teste (por exemplo, 1 a 3 passagens) e armazenadas congeladas como um material homogêneo. As células deste estoque original podem ser propagadas até o máximo de 20 passagens e são empregadas para testes de rotina, usando o meio de manutenção/crescimento apropriado (meio de Eagle Modificado por Dulbecco – DMEM, em inglês –, contendo soro e antibióticos, como puromicina, no meio de manutenção seleção, e penicilina/estreptomicina, para evitar a contaminação), conforme descrito no protocolo do método de teste[24]. No entanto, nenhum antibiótico é adicionado ao meio durante o teste.

[3] BASF SE, 67056 Ludwigshafen, Alemanha.

13. Para o teste, as células devem estar 80 a 90% confluentes e deve-se tomar cuidado para garantir que as células nunca sejam cultivadas até a confluência total. Um dia antes do teste, as células são coletadas e distribuídas em placas de 96 poços, à densidade celular apropriada (10.000 células/poço). Atenção deve ser dada para evitar a sedimentação das células durante a semeadura, para garantir a distribuição homogênea do número de células nos poços. Se esse não for o caso, essa etapa pode resultar em alta variabilidade poço a poço. Para cada repetição do teste principal da luciferase – e para cada concentração química em teste –, três réplicas são usadas, para as medições da atividade da luciferase, e três réplicas usadas, para o ensaio de viabilidade celular.

Preparação das substâncias químicas e de controle

14. A substância química em teste e as substâncias de controle são preparadas (ou descongeladas, no caso de soluções congeladas estáveis) no dia do teste. As substâncias químicas em teste são dissolvidas num solvente adequado, como dimetilsulfóxido (DMSO, CAS Nº 67-68-5, 99% de pureza) até à concentração final que permita atingir a concentração máxima testada (por exemplo, 200mM). As soluções de DMSO podem ser consideradas autoesterilizantes, de modo que nenhuma filtragem estéril é necessária. As substâncias químicas de teste não solúveis em DMSO são dissolvidas em água estéril ou meio de cultura, para as quais devem ser tomadas as medidas apropriadas para assegurar que as soluções finais sejam estéreis. Para uma substância química em teste que não tenha peso molecular definido (PM), uma solução padrão é preparada para a concentração padrão de 200mg/mL ou 20% (p/v). No caso de usar solventes que não sejam DMSO, água ou meio de cultura, a justificativa científica apropriada deve ser fornecida.

15. Com base nas soluções de estoque do teste químico, diluições em série são feitas usando-se DMSO ou, para substâncias químicas não solúveis em DMSO, usando-se água estéril ou meio de cultura, para obter concentrações principais da substância química a ser testada (por exemplo, 12 concentrações variando de 0,098 a 200mM). Independentemente do solvente utilizado, as concentrações mestres são depois diluídas 25 vezes em meio de cultura contendo soro e, finalmente, utilizadas para tratamento com mais um fator de diluição de 4 vezes, de modo que as concentrações finais do químico testado sejam atingidas (por exemplo, variando de 0,98 para 2000μM, com base num fator de diluição de 2). Para uma substância química em teste que não tenha PM definido, diluições sequenciais são feitas, usando-se o DMSO ou outro solvente adequado, para se obter as concentrações finais desejadas da substância química em teste (por exemplo, de 0,98 a 2.000μg/ml).

16. Um teste de determinação da dose pré-faixa de citotoxicidade é realizado primeiro, com base e nas concentrações acima, por exemplo, para determinar a concentração na qual a viabilidade celular é reduzida para 75% (CV_{75}). O VC_{75} é então usado como base para determinar as concentrações a serem testadas no teste principal de luciferase e no teste de citotoxicidade paralela (por exemplo, uma concentração acima de VC_{75} e quatro concentrações abaixo de VC_{75}, usando-se um fator de diluição serial de 1,2 e resultando nas concentrações de VC_{75}/ 2,07, VC_{75}/ 1,73, VC_{75}/ 1,44, VC_{75}/ 1,2, VC_{75} e VC_{75} x1,2μM). Podem ser utilizadas concentrações alternativas, quando houver justificativa (no caso de citotoxicidade muito baixa ou muito alta ou fraca solubilidade)[24].

17. Um controle solvente/veículo concorrente deve ser testado dentro de cada repetição (DMSO), para a qual um número suficiente de poços deve ser preparado por placa (12, para o teste de detecção de dose pré-faixa de citotoxicidade, e 24, para o teste principal de luciferase, como descrito no protocolo[24]). O solvente/veículo de controle sofre as mesmas diluições que as descritas para as concentrações mestres no parágrafo 15, de modo que a concentração final do controle de solvente/veículo corresponda à mesma concentração das substâncias químicas testadas – e no controle positivo (1%) – e não afete significativamente a viabilidade celular. Para uma substância química em estudo não solúvel no solvente utilizado (por exemplo, DMSO), para a qual as diluições foram feitas em água, o nível de solvente em todos os poços da solução de teste final desta substância química deve ser ajustado para ser igual à concentração de solvente usada para os outras substâncias químicas e substâncias de controle (1%).

18. Um controle negativo concomitante também deve ser testado dentro de cada repetição, para o qual número suficiente de poços deve ser preparado, por placa (por exemplo, 3, para o teste de detecção de dose pré-amplitude de citotoxicidade, e 6, para o teste principal de luciferase, conforme descrito no protocolo[24]). No método de teste LuSens, o controle negativo concorrente testado é de 5.000μM (ou 450μg/mL) de ácido DL-láctico (CAS nº 50-21-5, ≥99% de pureza), conhecido por ser um não sensibilizador e resultar numa previsão negativa com o método de teste LuSens. Outros controles negativos adequados podem ser usados, se os dados históricos estiverem disponíveis, para derivar critérios de aceitação de execução comparáveis. Além disso, no método de ensaio de LuSens, número suficiente de poços (6, para o teste de determinação da dose pré-intervalo de citotoxicidade, e 12, para o teste principal da luciferase, conforme descrito no protocolo[24]), contendo controles do meio em branco, é preparado com células não tratadas e meio de cultura apenas.

19. Um controle positivo concorrente deve também ser testado em número suficiente de poços dentro de cada repetição, para demonstrar uma resposta apropriada do sistema de teste (2, para o teste de determinação de dose pré-intervalo de citotoxicidade, e 5, para o teste principal de luciferase, como descrito no protocolo[24]). Para o método de teste LuSens, é utilizado Dimetacrilato de Etileno Glicol a 120μM (EGMDA, CAS Nº 97-90-5, ≥99% de pureza). O controle positivo é preparado utilizando os mesmos passos de diluição descritos para as concentrações mestres no parágrafo 14 e conforme descrito nos protocolos do método

de teste[24]. Se a concentração de controle positivo de 120μM for demasiada tóxica ou incapaz de induzir luciferase ≥2,5 (ver parágrafo 31), devido, por exemplo, a uma nova instalação de laboratório ou um novo lote de EGMDA, o laboratório pode executar um experimento com EGDMA (confirmado em, pelo menos, mais duas execuções), a fim de definir a concentração na qual a indução de luciferase é ≥2,5 vezes, em comparação com controle de solvente/veículo, e para a qual a viabilidade celular é ≥70%. Finalmente, outros controles positivos adequados, preferencialmente fornecendo valores $EC^{1.5}$ na faixa intermediária, podem ser usados, se dados históricos estiverem disponíveis para derivar critérios de aceitação de execução comparáveis.

Aplicação das substâncias químicas e de controle de teste

20. Para cada substância química de teste e cada substância de controle positivo, é necessário um ensaio para derivar uma previsão (positiva ou negativa), consistindo em, pelo menos, duas repetições independentes, contendo três réplicas (n=6) em cada. No caso de resultados discordantes entre as duas repetições independentes, uma terceira repetição, contendo três réplicas, deve ser realizada (n=9). Cada repetição independente é realizada em um dia diferente, com a solução de estoque fresco de substâncias químicas em teste e células colhidas independentemente. As células podem vir da mesma passagem.-

21. Após a semeadura, como descrito no parágrafo 13, as células são cultivadas durante 24 horas nas placas de microtitulação de 96 poços. O meio é removido e substituído por meio de cultura fresco (150μl de soro contendo DMEM, mas sem antibióticos, como descrito no protocolo do método[24]) ao qual são adicionados 50μl de produto químico em teste e das substâncias de controle diluídas 25 vezes. Pelo menos ,um poço por placa deve ser deixado vazio (sem células e sem tratamento) para avaliar os valores de fundo.

22. As placas tratadas são incubadas durante cerca de 48 horas a 37± 1°C, na presença de 5% de CO_2. Deve-se ter cuidado para evitar a evaporação de substâncias químicas em teste voláteis e a contaminação cruzada entre poços, por exemplo, cobrindo as placas com uma folha durante a incubação.

Medidas de atividade da luciferase

23. A seguir, destacamos os principais fatores para garantir uma leitura apropriada de luminescência:

- A escolha de um luminômetro sensível
- O uso de um formato de placa com altura suficiente para evitar a contaminação cruzada
- O uso de um substrato de luciferase com saída de luz suficiente para assegurar sensibilidade e baixa variabilidade
- Um nível de base adequado e estável

Antes do teste, uma configuração de experimento de controle, conforme descrito no anexo 3 deste Apêndice, deve ser realizada, para garantir que esses três pontos sejam atendidos.

24. Após o tempo de exposição de 48 horas com a substância química em teste e as substâncias de controle, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato e o tampão de lise, apropriado para leituras de luminescência, adicionados a cada poço durante tempo suficiente (por exemplo: 5-10 min no escuro).

25. As placas com o lisado celular são colocadas no luminômetro para leitura, utilizando-se o programa específico prescrito no protocolo do método de teste[24]. No caso de serem usadas configurações alternativas, por exemplo, dependendo do modelo de luminômetro utilizado, estas devem ser justificadas. Além disso, um substrato luminoso também pode ser usado, desde que o experimento de controle de qualidade do anexo 3 deste Apêndice seja conduzido com sucesso.

Avaliação de citotoxicidade

26. Para o ensaio de viabilidade celular de LuSens, o meio é substituído após 48 horas de exposição, com meio fresco contendo 0,5mg/ml de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5difeniltetrazólio, tiazolilo azul tetrazólio brometo; CAS Nº 298-93-1) e as células são incubadas durante 2 horas a 37±1°C, na presença de 5% de CO_2. O meio MTT é então removido e as células são lisadas, utilizando-se um agente de lise apropriado, durante período de tempo suficiente (por exemplo, 10% (p/v) de SDS e 0,4% (v/v) de solução de ácido acético em DMSO durante 5 min). Após agitação, a absorção é então medida usando-se os parâmetros descritos no protocolo do método de teste[24].

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação de dados

27. Os seguintes parâmetros são calculados no método de teste LuSens (ver

anexo 4 deste suplemento para as equações detalhadas):

- Fator de indução da atividade da luciferase em todas as concentrações da substância química testada, controle positivo e controle negativo
- Viabilidade celular (VC) em todas as concentrações da substância química testada e para todos os controles, buscando determinar (por interpolação) o valor da concentração na qual ocorrem 75% da viabilidade celular (VC_{75})

28. Para cada concentração mostrando uma indução de atividade de luciferase $\geq$ 1,5, a significância estatística é determinada (usando um teste t- Student bicaudal), comparando os valores de luminescência das três amostras replicadas com os valores da luminescência nos poços de controle de solvente/veículo, para avaliar se a indução da atividade da luciferase é estatisticamente significativa ($p<0,05$). Além disso, deve ser verificado que não ocorrem efeitos citotóxicos significativos a estas concentrações (ou seja, que a viabilidade celular é $\geq$70% nas concentrações, levando ao fator de 1,5 de indução de luciferase).

29. Recomenda-se que os dados sejam verificados visualmente com a ajuda de gráficos. Se não for observada uma curva dose-resposta clara ou se a curva dose-resposta obtida for bifásica (cruzar o limiar de 1,5 duas vezes), a experiência deve ser repetida, para verificar se é específica da substância química em estudo ou artefato. No caso de a resposta bifásica ser reprodutível numa experiência independente, deve ser relatada a menor concentração, isto é, quando o limiar de 1,5 é cruzado na primeira vez. Entretanto, uma concentração que forneça um $EC_{1.5}$ não é um requisito.

30. Finalmente, quando, no método de teste de LuSens, um fator de indução de atividade de luciferase de $\geq$1,5 é observado apenas na concentração testada mais baixa (por exemplo,VC_{75}/ 2,07), o reteste deve ser realizado utilizando, pelo menos, uma concentração inferior adicional.

Critérios de aceitação

31. Os seguintes critérios de aceitação devem ser atendidos ao se usar o método de teste LuSens. Se algum dos critérios listados abaixo não for atendido, os dados devem ser descartados e uma nova repetição deve ser executada.

- Na indução média da atividade da luciferase obtida com o controle positivo, o EGDMA 120μM (ou concentração comparável – ver parágrafo 19) deve ser $\geq$2,5 e o controle positivo deve ter viabilidade celular relativa $\geq$70% em comparação com o controle de solvente/veículo

- A indução média da atividade da luciferase obtida com o controle negativo, isto é, ácido DL-láctico a 5.000mM, bem como a expressão basal de células não tratadas devem ser <1,5 vez superiores à média do controle de solvente/veículo
- O coeficiente médio de variação da leitura de luminescência para os controles solvente/veículo (por exemplo, DMSO) deve ser inferior a 20% em cada repetição
- Ao menos três concentrações de teste devem ter viabilidade celular de, no mínimo, 70% em relação aos controles solventes/veículos. Portanto, no caso de um resultado ser considerado negativo, pelo menos uma concentração deve ser citotóxica, ou seja, ter uma viabilidade celular <70%, ou a concentração máxima de 2.000μM (ou 2.000μg/mL, para substâncias sem MW definida) deveria ter sido testada.

32. Em alguns casos, as substâncias químicas em teste podem não induzir citotoxicidade, casos nos quais a concentração máxima testada deve ser de 2.000μM (ou 2.000μg/mL, para substâncias químicas em teste com PM indefinido). Se, no teste principal de luciferase, nenhuma concentração é citotóxica, isto é, tem uma viabilidade celular <70%, e nenhuma indução de luciferase é observada, então uma segunda repetição deve ser realizada usando-se um fator de diluição em série de 1,44 com base noVC_{75} (começando com 1,44 xVC_{75}), em vez do fator de diluição em série de 1,2 – utilizado no teste principal de luciferase. Se, na segunda repetição, a citotoxicidade e a indução da luciferase ainda não forem observadas, uma terceira repetição deve ser realizada, com a concentração máxima de 2.000μM (ou 2.000μg/mL, para substâncias com PM indefinido). Esta repetição deve então ser confirmada executando-se uma quarta repetição.

Interpretação de resultados e modelo de previsão

33. Uma previsão de LuSens é considerada positiva se as seguintes condições forem satisfeitas em 2 de 2 repetições ou nas mesmas 2 de 3 repetições; caso contrário, a previsão de LuSens é considerada negativa (figura 1):

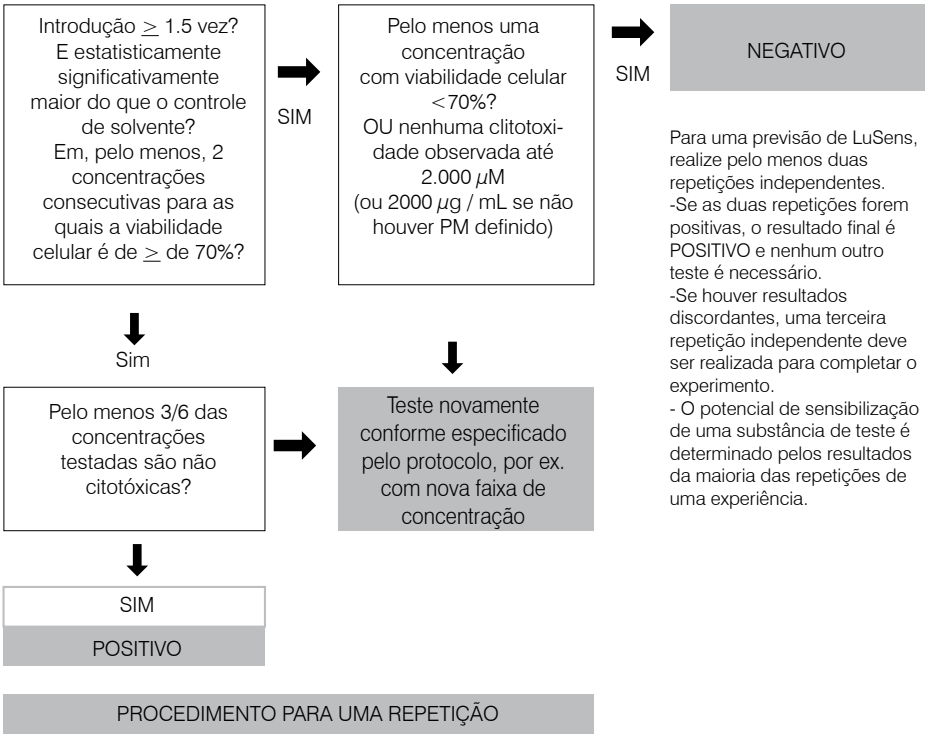
- O fator de indução da luciferase ≥ 1,5 é estatisticamente significativo, em comparação com o controle do solvente em, pelo menos, 2 concentrações consecutivas testadas não citotóxicas (viabilidade celular ≥ 70%), onde, pelo menos, três concentrações testadas devem ser não citotóxicas (viabilidade celular ≥ 70%).

34. Além disso, um resultado negativo também deve ser considerado como inconclusivo se for obtido com a substância química em teste que não forme uma dispersão estável e que não se tenha testado até 2.000μM (ou 2000μg/mL, para substâncias químicas em teste sem PM definido) e para a qual não se observe citotoxicidade em quaisquer das concentrações testadas (ver parágrafo 31) (ver parágrafo 4).

Figura 2. Visão geral dos critérios que levam a uma previsão no método de teste LuSens.

Uma previsão LuSens deve ser considerada no âmbito de um método definido ou de um AITA e de acordo com o disposto nos números 4, 7 e 8 da introdução geral.

Relatório de teste



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

Substância química em teste

Substância monoconstituinte:

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores, como número de lote e data de validade

- Aspecto físico, solubilidade em água, solubilidade em DMSO, peso molecular e propriedades físico-químicas relevantes adicionais, na medida do disponível
- Declaração sobre a (in)solubilidade ou dispersão estável no meio de exposição
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente viável, etc.
- Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
- Concentração(ões) testada(s)
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível

Substância multiconstituinte, UVCB e mistura:

- Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, identidade química (ver acima), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver acima) dos constituintes, na medida em que estejam disponíveis
- Aspecto físico, solubilidade em água, solubilidade em DMSO e propriedades físico-químicas adicionais relevantes, na medida do possível
- Declaração de (in)solubilidade ou dispersão estável no meio de exposição
- Peso molecular ou peso molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas ou outras informações relevantes para a condução do estudo
- Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
- Concentração(ões) testada(s)
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível

Controles

Controle positivo:

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS, Código SMILES ou InChI, fórmula estrutural e / ou outros identificadores
- Aspecto físico, solubilidade em água, solubilidade em DMSO, peso molecular e propriedades físico-químicas adicionais relevantes, na medida do possível e quando aplicável
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente praticável, etc.
- Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)

- Concentração(ões) testada(s)
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
- Referência a resultados de controle positivo históricos que demonstrem critérios de aceitação de execução adequados, se aplicável

Controle de solvente/veículo:

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS e/ou outros identificadores
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente praticável, etc.
- Aspecto físico, peso molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, caso sejam utilizados outros solventes/veículos além dos mencionados neste Apêndice e na medida do possível
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
- Justificativa para a escolha do solvente/veículo para cada substância química em estudo

Controle negativo:

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) CAS e/ou outros identificadores
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente praticável, etc.
- Aspecto físico, peso molecular e propriedades físico-químicas adicionais relevantes, no caso em que sejam utilizados outros controles negativos que os mencionados neste Apêndice e na medida em que estejam disponíveis
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
- Justificativa para escolha do controle negativo, no caso de outros controles, além dos já mencionados na Diretriz de Teste

Condições do método de teste

- Nome e endereço do patrocinador, da instalação de teste e do diretor de estudo
- Descrição do método de teste utilizado

- Linhagem celular usada, suas condições de armazenamento e fonte (por exemplo, a facilidade da qual foram obtidas)
- Número de passagem e nível de confluência das células utilizadas para teste
- Método de contagem de células usado para semear antes dos testes e medidas tomadas para assegurar a distribuição homogênea do número de células (ver parágrafo 13)
- Luminômetro usado (por exemplo, modelo), incluindo configurações do instrumento, substrato de luciferase usado e demonstração de medidas de luminescência apropriadas com base no teste de controle descrito no anexo 3 deste Apêndice
- O procedimento usado para demonstrar a proficiência do laboratório na execução do método de teste (por exemplo, testando as substâncias de proficiência) ou para demonstrar o desempenho reproduzível do método de teste ao longo do tempo

Procedimento de teste

- Número de repetições e réplicas usadas
- As concentrações das substâncias químicas em teste, os procedimento de aplicação e o tempo de exposição usado, se diferente do recomendado
- Descrição dos critérios de avaliação e decisão utilizados
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados
- Descrição de quaisquer modificações do procedimento de teste

Resultados

- Tabulação das atividades de fator de indução da luciferase e valores de viabilidade (CV_{75} para o método de teste LuSens) obtidos para a substância química em teste e para o controle positivo de cada repetição
- Os valores médios (ou seja, meios aritméticos de viabilidade celular e indução da atividade da luciferase) e DP (desvio padrão) calculados usando-se dados de todas as repetições individuais
- Uma indicação da classificação da substância química em teste, de acordo com o modelo de previsão
- Coeficiente de variação obtido com as leituras de luminescência para o controle de solvente/veículo para cada experimento

- Um gráfico representando as curvas dose-resposta para indução da atividade e da viabilidade da luciferase
- Descrição de quaisquer outras observações relevantes, se aplicável

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o método de teste de LuSens
- Consideração dos resultados do método de teste no contexto de um AITA, se outras informações relevantes estiverem disponíveis

Conclusão

LITERATURA

1) 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. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En
2) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.
3) Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.
4) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.
5) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1, 45-49.
6) OECD (2015). Guidance Document Nº 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-NrF2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing- assessment-publications-number.htm

7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. Toxicol. *In Vitro* 28, 1482-1497.

8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., MehlingA., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. Toxicol. *In Vitro* 32, 278-286.

9) EURL ECVAM (2018). The LuSens test method Validation Study Report. Accessible at: https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-10

10) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf.

11) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam- recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

12) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

13) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J. Appl. Toxicol. 33, 1353-1364.

14) Casati S., Aschberger K., Asturiol D., Basketter D., Dimitrov S., Dumont C., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P., Patlewicz G., Roberts D.W., Worth A. (2016). Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. EUR 27752 EN. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl- ecvam-status-reports/pre-prohapten-workshop-report.

15) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: com-

bining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

16) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

17) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing Nº 457. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

18) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report Nº 87).

19) Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S.N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016). Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Non-animal Test Methods for Skin Sensitization. Chem. Res. Toxicol. 29, 901-13.

20) Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. Arch. Biochem. Biophys. 344, 387-396.

21) Ade N, Leon F, Pallardy M, Peiffer JL, Kerdine-Romer S, Tissier MH, Bonnet PA, Fabre I, Ourlin JC.(2009); HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. Toxicol Sci. 2009 Feb;107(2):451-60.

22 Rob J. Vandebriel, Jeroen L. A. Pennings, Kirsten A. Baken, Tessa E. Pronk, Andre Boorsma, Ralph Gottschalk, Henk Van Loveren; Keratinocyte Gene Expression Profiles Discriminate Sensitizing and Irritating Compounds, Toxicological Sciences, Volume 117, Issue 1, 1 September 2010, Pages 81-89, https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq182

23) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSensTM cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *In Vitro* 27, 2225-2232.

24) DB-ALM Protocol Nº 184 (2017). LuSens Assay. Available at https://ecvamdbalm.jrc.ec.europa.eu

25) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology 33, 1337-1352.

26) Basketter D.A., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinozzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. Dermatitis 25, 11-21.

APÊNDICE IB - ANEXO 1: substâncias de proficiência

Sensibilização cutânea in vitro: o método de ensaio ARE-Nrf2 Luciferase LuSens

Antes do uso rotineiro de um método de teste que atenda a este Apêndice da Diretriz de Teste 442D, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica obtendo corretamente a previsão esperada para as 10 Substâncias de Proficiência, recomendadas na tabela 1, obtendo os valores brutos que caiam dentro da respectiva faixa de referência para, pelo menos, oito das dez substâncias de proficiência. Estas substâncias de proficiência foram selecionadas para representar a faixa de respostas para os riscos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção foram: disponibilidade comercial, disponibilidade de referência *in vivo* de alta qualidade e disponibilidade de dados *in vitro* de alta qualidade do método de teste LuSens.

Tabela 1: Substâncias recomendadas para demonstrar proficiência técnica com o método de teste LuSens.

					LuSens		
Substâncias de Proficiência	**CASRN**	**Estado físico**	**Previsão LLNA[1]**	**Categoria Humana[2]**	**Previsão in vitro[3]**	**Faixa de referência $EC_{1.5}$ (μM)[4]**	**Faixa de referência CV_{75} (μM) [4]**
Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	Não sensibilzador	Cat. 6	Negativo	> 1.000	> 2.000
Glicerol	58-81-5	Líquido	Não sensibilzador	Cat. 6	Negativo	> 1.000	> 2.000

					LuSens		
Substâncias de Proficiência	**CASRN**	**Estado físico**	**Previsão LLNA[1]**	**Categoria Humana[2]**	**Previsão in vitro[3]**	**Faixa de referência $EC_{1.5}$ (μM)[4]**	**Faixa de referência CV_{75} (μM) [4]**
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Não sensibilzador	Cat. 5	Negativo	> 1.000	> 2.000
Sulfanilamida	63-74-1	Sólido	Não sensibilzador	"Negativo (Basketter *et al.* 1994)"	Negativo	> 1.000	> 2.000
Eugenol	97-53-0	Líquido	Sensibilizador (fraco)	Cat. 3	Positivo	<500	<1.000
Álcool cinamílico	104-30-4	Sólido	Sensibilizador (fraco)	Cat. 3	Positivo	<170	>420
2-Mercapto-benzotiazole	149-30-4	Sólido	Sensibilizador moderado)	Cat. 3	Positivo	<800	<2.000
Sulfato de 4-meti-laminofenol	55-55-0	Sólido	Sensibilizador (forte)	Cat. 3	Positivo	<30	<50
Metildibromo glutaronitrilo	35691-65-7	Sólido	Sensibilizador (forte)	Cat. 2	Positivo	<25	<50
2,4-dinitro-clorobenzeno	97-00-7	Sólido	Sensibilizador (extremo)	Cat. 1	Positivo	<5	<10

Notas:[1] As previsões de risco (e potência) in vivo *são baseadas em dados de LLNA[(25)]. A potência* in vivo *é derivada usando-se os critérios propostos pelo ECETOC[(18)].*

[2] Segundo Basketter e colaboradores[(26)]. Cat. 1 representa evidência clara de alergia de contato, Cat. 2 uma causa frequente de alergia de contato, Cat. 3 uma causa comum de alergia de contato, Cat. 4 uma causa infrequente de alergia de contato, Cat. 5 uma causa rara de alergia de contato e Cat. 6 evidência essencialmente ausente de alergia de contato.

[3] Uma previsão do método do teste da luciferase ARE-Nrf2 deve ser considerada no âmbito de um Método Definido ou de um AITA e de acordo com as disposições dos parágrafos 7 e 8 da introdução geral.

[4] Baseado nos valores históricos observados[(7-8)]. Embora o $EC_{1.5}$ não faça parte do modelo de previsão de LuSens, ele pode ser calculado a partir dos dados obtidos e usado para determinar as faixas de resposta de LuSens para as Substâncias de Proficiência. Os valores de $EC_{1.5}$ foram calculados de acordo com o Apêndice IA (parágrafo 26).

APÊNDICE IB - ANEXO 2: Comparação das principais etapas do protocolo dos métodos de teste LuSens e MRV Keratino-Sens™

	MRV (KeratinoSnens™)	LuSens
Preparação das culturas de queratinócitos		
Propagação	2 a 4 passagens	1 a 3 passagens
Estoque criopreservado	2 a 4 passagens	3 passagens
Pssagem das células antes do experimento principal	Ao menos, 2	Ao menos, 5
Propagação máxima do número de passagens de estoques congelados	25 passagens	20 passagens por teste de avaiação de faixa de citotoxicidade, 15 passagens para o teste principal de luciferase
Meio de propagação	DMEM contendo soro e Geneticina	DMEM contendo soro, penicilina/ estreptomicina e puromicina
Confluência das células por teste	80-90%	
Coleta das células antes do teste	1 dia	
Formato da placa usada para teste	Placa de 96 poços	
Número de células semeadas por teste	10.000 células/ poço, exceto nos poços usados para medidas de fundo	
Número de réplicas para cada concentração de produto químico em teste (em cada repetição)	3 pocos (em placas independentes) para medida de luciferase e 1 poço para avaliação de citotoxicidade	3 poços (na mesma placa) para todos os testes, isto é, o teste de pesquisa de faixa de toxicidade e o teste principal de luciferase (incluindo 3 poços para medida de luciferase e 3 poços para a avaliação de citotoxicidade em paralelo)
Preparação do produto químico em teste e substâncias de controle		
Preparação	No mesmo dia do teste	
Solvente	DMSO, água ou meio estéril para aqueles itens de testes não são solúveis em DMSO	DMSO ou meio para aqueles itens de teste não solúveis em DMSO
Concentração de estoque	200mM	
Itens de teste sem peso molecular definido	Solução de estoque preparada em concentrações padrão (40mg/mL ou 4% (p/v)	Solução de estoque preparada em concentração padrão (200 mg/mL ou 20% (p/v))
Faixa de concentraçào final testada em placa de 96 poços	12 concentrações (diluição de 2 vezes, variando de 0.98 até a 2.000 μM)	Ensaio do intervalo de citotoxicidade: 12 concentrações (diluição de 2 vezes) Teste da luciferase principal: 6 concentrações (diluição de 1,2 vezes) variando de CV_{75} / 2,074 a CV_{75}x1,2 μM
Controle de Solvente	1% DMSO (18 réplicas por repetição)	1% DMSO (12 réplicas por repetição para teste de faixa de citotoxicidade e 24 repetições por repetição para o teste principal de luciferase)
Controle Negativo	Veja controle de solvente	Ácido DL-Láctico 5.000 M (3 réplicas por repetição para teste de faixa de citotoxicidade e 6 réplicas por repetição para o teste principal de luciferase)

	MRV (KeratinoSnens™)	**LuSens**
Controle Positivo	Aldeído Cinâmico: Quatro concentrações (diluição de 2 vezes) variando de 4 a 64 μM (3 réplicas por repetição)	120 M de EGDMA ou concentração alternativa que induz a luciferase = 2,5 vezes, e para as quais a viabilidade celular é de ± 70% (2 réplicas por repetição para o teste de faixa de citotoxicidade e 5 repetições por repetição para o teste de luciferase principal)
Controle do meio	Não se aplica	6 réplicas por repetição para o teste de detecção de gama de citotoxicidade e 12 réplicas por repetição para o teste principal de luciferase
Controle em branco (sem células)	3 réplicas por repetição	1 réplica por repetição
Aplicação do produto químico em teste e das substâncias de controle & pontos de término avaliados		
Número de repetições para cada concentração de produto químco em teste	Ao menos, duas repetições independentes, cada uma contendo 3 réplicas (n=6)' e, no caso de resultados discordantes, uma terceira repetição deve ser realizada (n=9)'. Cada repetição é conduzida num dia diferente com produtos químicos preparados frescos e células coletadas independentemente (mas eventualmente tendo o mesmo número de passagens)	
Meio de tratamento das células	150 μl de cultura DMEM, contendo soro sem antibióticos (i.e. Geneticina, penicilina / estreptomicina e puromicina), aos quais são adicionados 50 μl dos produtos químicos e substâncias de controle diluídas 25 vezes	
Tempo de exposição	48 horas a 37 ± 1° C na presença de 5% de CO_2. As placas são cobertas com uma folha para evitar a evaporação de produtos químicos de teste voláteis e contaminação cruzada entre poços	
Medidade deatividade de luninescência	Após a exposição, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato e o tampão de lise, relevante para leituras de luminescência, é adicionado a cada poço durante 20 min à temperatura ambiente. As placas com o lisado celular são colocadas no luminômetro para leitura, o qual é programado para: i) adicionar o substrato da luciferase a cada poço, ii) esperar 1 segundo e iii) integrar a atividade da luciferase durante 2 segundos.	Após a exposição, o tampão de lise, relevante para leituras de luminescência, é adicionado a cada poço por 5-10 min, sob agitação no escuro. A luminescência é medida por 2 segundos usando um luminômetro. Outras condições podem ser aplicadas dependendo do luminômetro utilizado.
Avaliação da citotoxicidade	Após a exposição, adicionam-se 5 mg/ml de solução de MTT e as células são incubadas 4h a 37 ± 1oC na presença de 5% de CO_2. As células são lisadas durante a noite (com solução SDS a 10%), agitadas e absorvidas a 600 nm.	Após exposição, 200 μL de solução de trabalho de MTT (0,5mg/ ml) são adicionados e as células são incubadas 2h a 37 ± 1oC na presença de 5% de CO_2. As células são lisadas durante 5 min (com 10% (p / v) de SDS e 0,4% (v / v) de ácido acético numa solução de DMSO) e a absorção é medida a 570 e 690 nm.
Avaliação de ponto de término	Imax: indução da dobra média máxima observada em qualquer concentração testada. EC1.5: concentração interpolada para a qual existe uma indução de 1,5 vezes da atividade da luciferase. IC50/ IC30: concentração interpolada na qual ocorrem 50% e 30% de redução da viabilidade celular, respectivamente.	Dobra da indução da atividade da luciferase como a média de cada concentração testada. Viabilidade celular como média de cada concentração testada. CV75: concentração interpolada na qual ocorre 75% de viabilidade celular.

	MRV (KeratinoSnens™)	LuSens
Critério de Aceitação		
Atividade de luciferase de controle positivo	> 1,5 vezes a indução estatisticamente significativa em, pelo menos, uma das concentrações testadas do controle positivo (4 a 64 μM de aldeído cinâmico). O valor EC1.5 do controle positivo deve estar entre 2SDs (desvios padrão) da média histórica (por exemplo, 2 a 30 μM no conjunto de dados de validação). A indução média de 64 μM de aldeído cinâmico deve estar entre 2 e 8.	Igual a Indução de 2,5 vezes com o controle positivo (por exemplo, 120 M de EGDMA) relativamente ao controle do solvente numa concentração não citotóxica, isto é, viabilidade celular = 70% em relação ao controle do solvente.
Atividade de luciferase de controle negativo	Não se aplica	<1,5 vezes de indução com o controle negativo (5,000 μM de ácido DL-láctico) em relação ao controle de solvente
Variabilidade do controle do solvente	Coeficiente de variação = 20% (18 réplicas)	Coeficiente de variação = 20% (ao menos, 21 réplicas)
Outros	Não se aplica	A expressão basal média do controle do meio (células com meio apenas) deve ter uma indução de atividade de luciferase <1,5 vez relativamente ao controle do solvente. Pelo menos, três concentrações de teste (das 6 no teste principal da luciferase) devem ser não citotóxicas (viabilidade celular = 70%). Além disso, no caso de um resultado negativo, pelo menos uma concentração testada (das 6 no teste principal da luciferase) deve ser citotóxica (viabilidade celular <70%).
Modelo de previsão		
Uma previsão é considerada positiva quando as seguintes condições são satisfeitas em 2 de 2 ou em 2 de 3 repetições; caso contrário, a previsão é considerada negativa.	1. Imax igual ou superior a (>) 1,5 vezes e estatisticamente significativamente diferente do controle de solvente (teste T de Student bicaudal e não pareado). 2. A viabilidade celular é superior a (>) 70% na concentração mais baixa com indução de atividade da luciferase igual ou superior a 1,5 vez (isto é, à concentração determinante $EC_{1,5}$). 3.O valor de EC1.5 é menor que (<) 1000 μM (ou <200 μg / mL para produtos químicos de teste sem PM definidos). 4. Existe um aparente aumento global dependente da dose na indução da luciferase.	1. Uma indução da luciferase superior ou igual a >) 1,5 vezes em comparação com o controle do solvente é observada em, pelo menos, 2 concentrações testadas não citotóxicas consecutivas (isto é, a viabilidade celular é igual ou superior a (>) 70%). 2. Pelo menos três concentrações testadas devem ser não citotóxicas (viabilidade celular igual ou superior a (>) 70%).
Produtos químicos que não formam uma dispersão estável	Resultado negativo obtido com produtos químicos de teste que não formam uma dispersão estável <1000 μM (ou <200 μg/ mL para produtos químicos de teste sem PM definidos), deve ser considerado inconclusivo	Resultado negativo obtido com produtos químicos de teste que não formam uma dispersão estável e não foram testados até 2000 μM (ou 2,000 μg / mL para produtos químicos de teste sem PM definidos) deve ser considerado inconclusivo

APÊNDICE IB - ANEXO 3: controle de qualidade para medições da luminescência

Experiência básica para garantir ótimas medições de luminescência no método de teste LuSens

Para garantir ótimas medições de luminescência, ao realizar o ensaio pela primeira vez, recomenda-se uma ou duas execuções do método de teste LuSens, usando concentrações crescentes de EGDMA, como uma substância de teste, e usando o *layout* da placa como descrito abaixo. Ao realizar estas repetições, os seguintes aspectos devem ser considerados:

- A indução da luciferase deve ser aumentada de forma dependente da dose (nos poços A-C: 1-6) após o tratamento com concentrações crescentes de EDGMA
- Não se deve observar aumento dependente da dose na indução da luciferase nos poços D: 1-6 e A-D: 7 (poços vazios/em branco) em comparação com os valores de luminescência nos poços A-D: 8-12
- A média percentual do desvio padrão da variabilidade em, pelo menos, 21 poços de controle de solvente/veículo (F-G: 1-12) deve estar abaixo de 20% e não deve apresentar nenhum padrão de gradiente

Tabela 1: Configuração da placa do primeiro experimento de treinamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EGDMA CV75/ 2.07	EGDMA CV75/ 1.73	EGDMA CV 75/1.44	EGDMA CV75/ 1.2	EGDMA CV75	EGDMA CV75X1.2						
B	EGDMA CV75/ 2.07	EGDMA CV75/ 1.73	EGDMA CV 75/1.44	EGDMA CV75/ 1.2	EGDMA CV75	EGDMA CV75X1.2						
C	EGDMA CV75/ 2.07	EGDMA CV75/ 1.73	EGDMA CV 75/1.44	EGDMA CV75/ 1.2	EGDMA CV75	EGDMA CV75X1.2						
D												
E	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	Ácido DL-Lático 5000 M						EGDMA 120 M				Em branco	

APÊNDICE IB - ANEXO 4: cálculos utilizados no teste de lusens

MÉTODO

1. **A indução da atividade de luciferase** (I_{max}) é calculada no método de teste de LuSens pela Equação 1, enquanto a indução de fator máxima total (I_{max}) é calculada como a média das repetições individuais.

$$\text{Equação 1:} \quad \text{Indução de fator} = \frac{L_{\text{amosta}} - V_{\text{em branco}}}{V_{\text{solvente}} - V_{\text{em branco}}} \text{x100}$$

Onde:

L_{amostra} é a leitura de luminescência no poço químico de teste;

$L_{\text{em branco}}$ é a leitura de luminescência no espaço em branco sem células e sem tratamento;

L_{solvente} é a leitura de luminescência média nos poços contendo células e controle de solvente.

2. **A viabilidade** no método de teste LuSens é calculada pela Equação 2:

$$\text{Equação 2:} \quad \text{Viabilidade} = \frac{V_{\text{amostra}} - V_{\text{em branco}}}{V_{\text{solvente}} - V_{\text{em branco}}} \text{x100}$$

Onde:

A V_{amostra} é a leitura de absorbância MTT no poço da substância química de teste;

$V_{\text{em branco}}$ é a leitura da absorbância MTT no poço em branco, sem células e sem tratamento;

V_{solvente} é a leitura média de absorbância de MTT nos poços contendo células e controle de solvente.

3. A concentração na qual a viabilidade celular é reduzida para 75% (CV_{75}) é calculada, no método de teste LuSens, pela interpolação linear, de acordo com a equação 3, enquanto o VC_{75} geral é calculado pela média geométrica das réplicas individuais.

$$\text{Equação 3:} \quad CV_{75} = (C_b - C_a) \times \left[\frac{(75 - V_b)}{(V_b - V_a)}\right] + Cb$$

Onde:

C_a é a concentração testada em μM com viabilidade celular logo acima de 75%;

C_b é a concentração testada em μM com viabilidade celular logo abaixo de 75%;

V_a é a% de viabilidade obtida com C_a;

V_b é a% de viabilidade obtida com C_b.

Adotado: 9 de outubro de 2017

Diretriz de OECD para o ensaio de substâncias químicas - 437

Método de Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina para Identificação: i) Substâncias Químicas Indutoras de Danos Oculares Graves e ii) Substâncias Químicas que Não Requerem Classificação para Irritação nos Olhos ou para Dano Ocular Grave

INTRODUÇÃO

1. O método de teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP) foi avaliado pelo Comitê de Coordenação Interinstitucional sobre a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM), em conjunto com o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) e o Centro Japonês de Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM), em 2006 e 2010[1,2]. Na primeira avaliação, o método de teste do BCOP foi avaliado quanto à sua utilidade na identificação de substâncias químicas (substâncias e misturas) que induzem danos oculares graves[1]. Na segunda avaliação, o método de teste BCOP foi avaliado quanto à sua utilidade para identificar substâncias químicas (substâncias e misturas) não classificadas para irritação ocular ou lesões oculares graves[2]. A base de dados de validação do BCOP continha 113 substâncias e 100 misturas no total[2,3]. A partir destas avaliações e da sua análise pelos pares, concluiu-se que o método de ensaio pode identificar corretamente substâncias químicas (substâncias e misturas) que causam danos oculares graves, bem como as que não exigem classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves, conforme definido pelas Nações Unidas (ONU) no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS)[4], pelo qual foi aprovado como cientificamente válido para ambos os fins. Lesões oculares graves são a produção de dano tecidual no olho, ou grave decaimento físico da visão, após a aplicação de uma substância química em teste na superfície anterior do olho, que não seja totalmente reversível dentro de 21 dias da aplicação. Substância químicas de teste que causam danos oculares graves são classificadas como Categoria 1 do GHS da ONU. Substâncias químicas não classificadas para irritação nos olhos ou lesões oculares graves são definidas como aquelas que não atendem aos requisitos de classificação como UN GHS Categoria 1 ou 2 (2A ou 2B), ou seja, elas são referidos como UN GHS Sem Categoria ("*No Category*" em inglês).

Esta Diretriz (adotada em 2009 e atualizada em 2013) inclui o uso recomendado e as limitações do método de teste BCOP, com base em suas avaliações. As principais diferenças entre a versão original de 2009 e a versão atualizada de 2013, dizem respeito, mas não se limitam: i) ao uso do método de teste BCOP para identificar substâncias químicas que não exigem classificação, de acordo com o GHS da ONU (parágrafos 2 e 7); ii) aos esclarecimentos sobre a aplicabilidade do método de ensaio BCOP ao ensaio de álcoois, cetonas e sólidos (parágrafos 6 e 7) e de substâncias e misturas (parágrafo 8); III) aos esclarecimentos sobre como as substâncias surfactantes e as misturas contendo surfactantes devem ser testadas (parágrafo 28); iv) às atualizações e aos esclarecimentos sobre os controles positivos (parágrafos 39 e 40); v) à atualização dos critérios de decisão do método de teste BCOP (parágrafo 47); vi) à atualização dos critérios de aceitação do estudo (parágrafo 48); vii) à atualização dos elementos do relatório de ensaio (parágrafo 49); viii) à atualização do anexo 1 sobre definições; ix) à adição do anexo 2 para a capacidade preditiva do método de teste BCOP sob vários sistemas de classificação; x) à atualização do anexo 3 sobre a lista de substâncias químicas de proficiência; e xi) à atualização do anexo 4 sobre o suporte corneal do BCOP (parágrafo 1) e sobre o opacitômetro (parágrafos 2 e 3).

2. Atualmente, é aceito que, no futuro provável, nenhum teste *in vitro* de irritação ocular será capaz de substituir o teste ocular de Draize *in vivo*, para prever toda a gama de irritação para diferentes classes químicas. No entanto, combinações estratégicas de vários métodos de teste alternativos, dentro de uma estratégia de teste (em camadas), podem substituir o teste do olho de Draize[5]. A abordagem de cima para baixo ("Top-Down" em inglês)[5] é projetada para ser usada quando, com base em informações existentes, espera-se que uma substância química tenha alto potencial de irritação; enquanto a abordagem de baixo para cima ("Bottom-Up" em inglês)[5] é projetada para ser usada quando, baseando-se em informações existentes, não se espera que uma substância química cause irritação ocular suficiente para exigir uma classificação. O método de teste BCOP é um método de teste *in vitro* que pode ser usado sob certas circunstâncias e com limitações específicas para classificação e rotulagem de substâncias químicas de risco para os olhos. Embora não seja considerado válido como um substituto independente para o teste do olho de coelho *in vivo*, o método de teste BCOP é recomendado como uma etapa inicial, dentro de uma estratégia de teste, como a abordagem Top-Down, sugerida por Scott *et al.*[5] para identificar substâncias químicas que provocam danos oculares graves, ou seja, aquelas a serem classificadas como Categoria 1 do GHS, sem testes adicionais[4]. O método de teste BCOP

também é recomendado para identificar substâncias químicas que não exigem classificação para irritação nos olhos ou lesões oculares graves, conforme definido pelo GHS (UN GHS No Category)[4], dentro de uma estratégia de teste como a abordagem Bottom-Up[5]. No entanto, uma substância química que não esteja prevista como causadora de lesões oculares graves ou como não classificada para irritação ocular/dano ocular grave com o método de teste BCOP exigiria testes adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*), para estabelecer uma classificação definitiva. A escolha do método de teste mais apropriado e a utilização desta diretriz devem ser vistas no contexto do Documento de Orientação da OECD sobre Abordagens Integradas de Teste e Avaliação para Danos Oculares Graves e Irritação Ocular[20].

3. O objetivo desta diretriz é descrever os procedimentos usados para avaliar o potencial risco de uma substância química ao olho, conforme medido por sua capacidade de induzir opacidade e aumentar a permeabilidade em uma córnea bovina isolada. Os efeitos tóxicos para a córnea são medidos por: (i) diminuição da transmissão de luz (opacidade) e (ii) aumento da passagem do corante de fluoresceína de sódio (permeabilidade). As avaliações de opacidade e permeabilidade da córnea, após a exposição a uma substância química em teste, são combinadas para derivar um Índice de Irritância *In Vitro* (IVIS), que é usado para classificar o nível de irritação da substância química em teste.

4. As definições são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

5. Esta diretriz baseia-se no protocolo do método de teste ICCVAM BCOP[6,7], que foi originalmente desenvolvido a partir de informações obtidas do protocolo do Institute for *In Vitro* Sciences (IIVS) e do protocolo INVITTOX 124[8]. Este último representa o protocolo utilizado para o estudo de pré-validação, patrocinado pela Comunidade Europeia, realizado em 1997-1998. Ambos os protocolos foram baseados no método de teste BCOP, primeiramente relatado por Gautheron *et al.*[9].

6. O método de teste BCOP pode ser usado para identificar substâncias químicas que causem danos oculares graves, conforme definido pelo GHS, ou seja, substâncias químicas a serem classificadas como Categoria 1[4] do GHS. Quando usado para este propósito, o método de teste BCOP tem precisão geral de 79% (150/191), taxa de falso positivo de 25% (32/126) e taxa de falso negativo

de 14% (9/65) – em comparação com os dados do método do teste do olho de coelho *in vivo*, classificados de acordo com o sistema de classificação do GHS[3] (ver anexo 2, tabela 1). Quando substâncias químicas de teste, dentro de certas classes químicas (álcoois, cetonas) ou físicas (sólidos), são excluídas do banco de dados, o método de teste BCOP tem precisão geral de 85% (111/131), taxa de falso positivo de 20% (16/81) e taxa de falso negativo de 8% (4/50), para o sistema de classificação do GHS[3]. As deficiências potenciais do método de teste BCOP, quando usadas para identificar substâncias químicas que causam dano ocular grave (UN GHS Categoria 1), são baseadas nas altas taxas de falsos positivos para álcoois e cetonas e na alta taxa de falsos negativos para sólidos[1-3]. No entanto, como nem todos os álcoois e cetonas são superestimados pelo método de teste BCOP e alguns são corretamente preditos como UN GHS Categoria 1, esses dois grupos funcionais orgânicos não são considerados fora do domínio de aplicabilidade do método de teste. Cabe ao usuário desta diretriz decidir se uma possível previsão exagerada de um álcool ou cetona pode ser aceita ou se testes adicionais devem ser realizados em uma abordagem baseada em evidências. Com relação às taxas de falso negativo para sólidos, deve-se observar que os sólidos podem levar a condições de exposição variáveis e extremas no teste de irritação ocular Draize *in vivo*, o que pode resultar em predições irrelevantes de seu real potencial de irritação[10]. Também deve se notar que nenhum dos falsos negativos identificados no banco de dados de validação do ICCVAM[2,3], no contexto da identificação de substâncias químicas indutoras de lesões oculares graves (UN GHS Categoria 1), resultou em IVIS $\leq$3, que é o critério usado para identificar uma substância química de teste como Sem Categoria no GHS. Entretanto, os falsos negativos do BCOP, neste contexto, não são críticos, pois todos as substâncias químicas testadas que produzem 3<IVIS $\leq$55 são posteriormente avaliadas com outros testes *in vitro* adequadamente validados ou, como última opção, em coelhos, dependendo dos requisitos regulatórios e da estratégia de teste sequencial em uma abordagem baseada e evidências. Dado o fato de que algumas substâncias químicas sólidas serem corretamente previstas pelo método de teste BCOP como Categoria 1 do GHS, este estado físico também não é considerado fora do domínio de aplicabilidade do método de teste. Os pesquisadores podem considerar o uso deste método de teste para todos os tipos de substâncias químicas, pelos quais IVIS>55 deve ser aceito como indicativo de uma resposta que induz danos oculares graves e que devem ser classificados como Categoria 1 do GHS, sem mais testes. No entanto, como já mencionado, os resultados positivos obtidos com álcoois ou cetonas devem ser interpretados com cautela, devido à potencial superestimação.

7. O método de teste BCOP também pode ser usado para identificar substâncias químicas que não exijam classificação para irritação nos olhos ou lesões oculares graves no sistema de classificação do GHS[4]. Quando utilizado para este fim, o método de teste BCOP tem precisão global de 69% (135/196), taxa de falso positivos de 69% (61/89) e taxa de falso negativo de 0% (0/107) – quando comparado com os dados do método do teste do olho de coelho *in vivo*, classificados de acordo com o sistema de classificação do GHS[3] (ver anexo 2, tabela 2). A taxa de falsos positivos obtidos (substâncias químicas UN GHS Sem Categoria *in vivo* produzindo IVIS>3 – ver parágrafo 47) é consideravelmente alta, mas não crítica, neste contexto, uma vez que todas as substâncias químicas teste que produzem um 3<IVIS ≤55 serão posteriormente avaliadas com outros testes *in vitro* adequadamente validados ou, como última opção, em coelhos, dependendo das exigências regulatórias, usando uma estratégia de teste sequencial em uma abordagem baseada em evidências. O método de teste BCOP não apresenta deficiências específicas para o teste de álcoois, cetonas e sólidos quando o objetivo é identificar substâncias químicas que não requerem classificação para irritação nos olhos ou lesões oculares graves (UN GHS Nenhuma Categoria)[3]. Os pesquisadores podem considerar o uso desse método de teste para todos os tipos de substâncias químicas, pelos quais um resultado negativo (IVIS≤3) deve ser aceito como indicativo de que nenhuma classificação é necessária (UN GHS Sem Categoria). Como o método de teste BCOP só pode identificar corretamente 31% das substâncias químicas que não requerem classificação para irritação nos olhos ou lesões oculares graves, este método de teste não deve ser a primeira escolha para iniciar uma abordagem Bottom-Up[5], se outro teste validado e se métodos *in vitro* aceitos com alta sensibilidade semelhante, mas maior especificidade, estiverem disponíveis.

8. A base de dados de validação do BCOP continha 113 substâncias e 100 misturas no total[2,3]. Por conseguinte, o método de ensaio BCOP é considerado aplicável ao ensaio de substâncias e misturas.

9. O método de teste BCOP não é recomendado para a identificação de substâncias químicas que devem ser classificadas como irritantes para os olhos (UN GHS Categoria 2 ou Categoria 2A) ou substâncias químicas que devem ser classificadas como levemente irritantes aos olhos (UN GHS Categoria 2B) devido ao número considerável de substâncias químicas da categoria 1 do GHS classificadas como UN GHS Categoria 2, 2A ou 2B e GHS Sem Categoria com classificação excessiva como Categoria 2, 2A ou 2B[2,3] do GHS. Para este propósito, testes adicionais com outro método adequado podem ser necessários.

10. Todos os procedimentos com olhos e córneas bovinas devem seguir os regulamentos e procedimentos aplicáveis da instalação de teste para o manuseio de materiais derivados de animais, que incluem, mas não estão limitados a, tecidos e fluidos de tecidos. Precauções laboratoriais universais são recomendadas[11].

11. Embora o método de teste BCOP não considere lesões conjuntivas e iridais, ele aborda os efeitos da córnea, que são os principais determinantes da classificação in vivo quando se considera a classificação do GHS. A reversibilidade das lesões da córnea não pode ser avaliada no método de teste BCOP. Foi proposto, com base em estudos com olhos de coelho, que uma avaliação da profundidade inicial da lesão na córnea possa ser usada para identificar alguns tipos de efeitos irreversíveis[12]. No entanto, mais conhecimento científico é necessário para entender como efeitos irreversíveis não relacionados com lesões iniciais de alto nível ocorrem. Finalmente, o método de teste BCOP não permite a avaliação do potencial de toxicidade sistêmica associada à exposição ocular.

12. Esta diretriz será atualizada periodicamente, conforme novas informações e dados são considerados. Por exemplo, a histopatologia pode ser potencialmente útil quando é necessária uma caracterização mais completa dos danos na córnea. Conforme descrito no Documento de Orientação da OECD nº 160[13], os usuários são encorajados a preservar córneas e preparar amostras histopatológicas que podem ser usadas para desenvolver um banco de dados e critérios de decisão que possam melhorar ainda mais a precisão deste método de teste.

13. Para qualquer laboratório que estabeleça inicialmente este método de teste, devem ser usadas as substâncias químicas de proficiência fornecidas no anexo 3. Um laboratório pode usar essas substâncias químicas para demonstrar sua competência técnica na execução do método de teste BCOP, antes de enviar os dados do teste BCOP, para fins de classificação de risco regulamentar.

PRINCÍPIO DO TESTE

14. O método de teste BCOP é um modelo organotípico, que fornece manutenção a curto prazo da função fisiológica e da bioquímica normal da córnea bovina *in vitro*. Neste método de teste, o dano é avaliado por medidas quantitativas de alterações na opacidade da córnea e permeabilidade com um opacitômetro e um espectrofotômetro de luz visível, respectivamente. Ambas as medições são

usadas para calcular um IVIS, que é usado para atribuir uma categoria de classificação de risco de irritabilidade *in vitro* para a previsão do potencial de irritação ocular *in vivo* de uma substância química em teste (ver parágrafo 47).

15. O método de teste BCOP usa córneas isoladas dos olhos de gado recém-abatido. A opacidade da córnea é medida, quantitativamente, como a quantidade de transmissão de luz através da córnea. A permeabilidade é medida, quantitativamente, como a quantidade de corante de fluoresceína de sódio que passa através da espessura total da córnea, como detectado no meio na câmara posterior. As substâncias químicas de teste são aplicadas na superfície epitelial da córnea por adição à câmara anterior do suporte da córnea. O anexo 4 fornece uma descrição e um diagrama de um suporte da córnea usado no método de teste BCOP. Os suportes da córnea podem ser obtidos comercialmente a partir de diferentes fontes ou podem ser construídos.

Fonte e Idade dos Olhos de Bovinos e Seleção de Espécies Animais

16. Bovinos enviados para matadouros são normalmente mortos para consumo humano ou para outros usos comerciais. Apenas animais saudáveis, considerados adequados para entrada na cadeia alimentar humana, são utilizados como fonte de córneas para uso no método de teste BCOP. Como o gado tem ampla gama de pesos, dependendo de raça, idade e sexo, não há peso recomendado para o animal no momento do abate.

17. Variações nas dimensões da córnea podem ocorrer quando se usam olhos de animais de diferentes idades. As córneas com diâmetro horizontal >30,5mm e espessura central da córnea (CCT) ≥1100μm são geralmente obtidas de bovinos com mais de oito anos, enquanto aquelas com diâmetro horizontal <28,5mm e CCT <900μm são obtidas de bovinos com menos de 8 anos[14]. Por essa razão, olhos de bovinos com mais de 60 meses não são tipicamente usados. Os olhos de bovinos com menos de 12 meses de idade não são tradicionalmente utilizados, uma vez que os olhos ainda estão em desenvolvimento e a espessura da córnea e o seu diâmetro são consideravelmente menores do que os relatados para olhos de bovinos adultos. Entretanto, o uso de córneas de animais jovens (6 a 12 meses de idade) é admissível, pois há algumas vantagens, como maior disponibilidade, faixa etária estreita e riscos reduzidos relacionados à exposição potencial do trabalhador à Encefalopatia Espongiforme Bovina[15]. Como uma

avaliação adicional do efeito do tamanho ou da espessura da córnea na resposta às substâncias corrosivas e irritantes pode ser útil, os pesquisadores são encorajados a relatar a idade estimada e/ou o peso dos animais que fornecem as córneas usadas em um estudo.

Coleta e Transporte de Olhos para o Laboratório

18. Os olhos são coletados pelos funcionários dos matadouros. Para minimizar os danos mecânicos e outros tipos de danos, os olhos devem ser enucleados assim que possível, após a morte, e resfriados imediatamente – após a enucleação e durante o transporte. Para evitar a exposição dos olhos a substâncias potencialmente irritantes, os funcionários do matadouro não devem usar detergente ao enxaguar a cabeça do animal.

19. Os olhos devem ser totalmente imersos em solução salina equilibrada de Hanks (HBSS), resfriados em um recipiente de tamanho adequado e transportados para o laboratório de maneira a minimizar a deterioração e/ou a contaminação bacteriana. Como os olhos são coletados durante o processo de abate, eles podem ser expostos a sangue e outras substâncias biológicas, incluindo bactérias e outros microrganismos. Portanto, é importante garantir que o risco de contaminação seja minimizado (por exemplo, mantendo o recipiente contendo os olhos no gelo úmido durante a coleta e o transporte e adicionando antibióticos ao HBSS usado para armazenar os olhos durante o transporte – por exemplo, penicilina em 100UI/mL e estreptomicina a 100μg/bmL).

20. O intervalo de tempo entre a coleta dos olhos e o uso de córneas no método de teste BCOP deve ser minimizado (normalmente coletados e usados no mesmo dia) e deve ser demonstrado o não comprometimento dos resultados do ensaio. Estes resultados baseiam-se nos critérios de seleção para os olhos, bem como nas respostas de controle positivo e negativo. Todos os olhos usados no ensaio devem ser do mesmo grupo de olhos coletados em um dia específico.

Critérios de seleção para olhos usados no método de teste BCOP

21. Os olhos, uma vez no laboratório, são cuidadosamente examinados quanto a defeitos, incluindo aumento da opacidade, arranhões e neovascularização. Apenas córneas de olhos livres de tais defeitos devem ser usadas.

22. A qualidade de cada córnea também é avaliada em etapas posteriores no ensaio. As córneas que têm opacidade maior do que sete unidades de opacidade, ou equivalente para o opacitômetro, e os suportes de córnea usados após período inicial de equilíbrio de uma hora devem ser descartados. O opacitômetro deve ser calibrado com padrões de opacidade que são usados para estabelecer as unidades de opacidade (consultar anexo 4).

23. Cada grupo de tratamento (teste químico, controles negativos e positivos concorrentes) consiste, no mínimo, de três olhos. Três córneas devem ser usadas como córneas de controle negativo no método de teste BCOP. Uma vez que todas as córneas tenham sido extirpadas de todo o globo e montadas nas câmaras de córnea, há potencial para artefatos trabalharem sobre os valores individuais de opacidade e permeabilidade da córnea (incluindo o controle negativo). Além disso, os valores de opacidade e permeabilidade das córneas de controle negativo são utilizados para corrigir os valores de opacidade e permeabilidade da córnea testados, tratados com substâncias químicas e tratados com controle positivo nos cálculos IVIS.

PROCEDIMENTO

Preparação dos Olhos

24. As córneas livres de defeitos são dissecadas com uma borda de esclerótica de 2 a 3mm para auxiliar no manuseio subsequente, com cuidado para evitar danos ao epitélio e ao endotélio. As córneas isoladas são montadas em suportes corneanos especialmente projetados, que consistem em compartimentos anterior e posterior, que interagem com os lados epitelial e endotelial da córnea, respectivamente. Ambas as câmaras são preenchidas abundantemente com o Meio Essencial Mínimo de Eagle isento de vermelho de fenol (EMEM) pré-aquecido (câmara posterior em primeiro lugar), assegurando-se que não são formadas bolhas. O dispositivo é então equilibrado a 32 ± 1°C durante, pelo menos, uma hora – para permitir que as córneas se equilibrem com o meio e para atingir a atividade metabólica normal, na medida do possível (a temperatura aproximada da superfície da córnea *in vivo* é de 32°C).

25. Após o período de equilíbrio, é adicionado EMEM livre de fenol vermelho pré-aquecido fresco em ambas as câmaras e as leituras de opacidade da linha de

base são tomadas para cada córnea. Quaisquer córneas que apresentem danos macroscópicos nos tecidos (arranhões, pigmentação, neovascularização) ou opacidade superior a sete unidades de opacidade ou equivalentes para o opacitômetro e para os suportes de córnea utilizados são descartadas. O mínimo de três córneas é selecionado como córneas de controle negativo (ou solvente). As córneas restantes são então distribuídas em grupos de tratamento e controle positivo.

26. Como a capacidade de calor da água é maior do que a do ar, a água fornece condições de temperatura mais estáveis para a incubação. Portanto, recomenda-se o uso de banho-maria para manutenção do suporte corneal e seu conteúdo a 32 ± 1°C. No entanto, também podem ser usadas incubadoras de ar, assumindo-se precauções para manter a estabilidade da temperatura (pré-aquecimento dos suportes e meios).

Aplicação da substância química de teste

27. Dois protocolos de tratamento diferentes são usados, um para líquidos e surfactantes (sólidos ou líquidos) e um para sólidos não surfactantes.

28. Os líquidos são testados sem diluição. Semissólidos, cremes e ceras são tipicamente testados como líquidos. Substâncias tensoativas puras são testadas à concentração de 10% p/v em uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, água destilada ou outro solvente que tenha demonstrado não ter efeitos adversos no sistema de teste. Justificativa apropriada deve ser fornecida para concentrações alternativas de diluição. As misturas que contêm surfactantes podem ser testadas não diluídas ou diluídas em concentração apropriada, dependendo do cenário de exposição relevante *in vivo*. Justificativa apropriada deve ser fornecida para a concentração testada. As córneas são expostas a líquidos e surfactantes por 10 minutos. O uso de outros tempos de exposição deve ser acompanhado de uma justificativa científica adequada. Ver o anexo 1 para uma definição de surfactante e mistura contendo surfactante.

29. Os sólidos não tensoativos são testados como soluções ou suspensões à concentração de 20% p/v em uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, água destilada ou outro solvente que tenha demonstrado não ter efeitos adversos no sistema de teste. Em certas circunstâncias e com a devida justificativa científica, os sólidos também podem ser testados puramente por aplicação direta na super-

fície da córnea usando-se o método de câmara aberta (ver parágrafo 32). As córneas são expostas a sólidos por quatro horas, mas, assim como com líquidos e surfactantes, outros períodos de exposição alternativos podem ser usados, com justificativa científica apropriada.

30. Diferentes métodos de tratamento podem ser usados, dependendo da natureza física e das características químicas (por exemplo, sólidos, líquidos, viscosos versus líquidos não viscosos) da substância química em teste. O fator crítico é garantir que a substância química de teste cubra adequadamente a superfície epitelial e que ela seja adequadamente removida durante as etapas de enxágue. Um método de câmara fechada é normalmente usado para substâncias químicas de teste não viscosas a líquidas levemente viscosas, enquanto um método de câmara aberta é usado para substâncias químicas de teste líquida viscosa e semiviscosa e para sólidos puros.

31. No método de câmara fechada, substância química de teste suficiente para cobrir o lado epitelial da córnea (750mL) é introduzida na câmara anterior, através dos orifícios de dosagem na superfície superior da câmara. Os orifícios são posteriormente selados com tampões de câmara durante a exposição. É importante garantir que cada córnea seja exposta a uma substância química teste pelo intervalo de tempo apropriado.

32. No método de câmara aberta, o anel de travamento da janela e a janela de vidro da câmara anterior são removidos antes do tratamento. O controle ou a substância química de teste (750μL, ou suficiente para cobrir completamente a córnea) é aplicada diretamente na superfície epitelial da córnea usando-se uma micropipeta. Se uma substância química de teste for difícil de pipetar, a substância química de teste pode ser carregada com pressão em uma pipeta de deslocamento positivo para auxiliar na dosagem. A ponta de pipeta de deslocamento positivo é inserida na ponta de distribuição da seringa, de modo que o material possa ser carregado na ponta de deslocamento sob pressão. Simultaneamente, o êmbolo da seringa é apertado para baixo, enquanto o êmbolo da pipeta é puxado para cima. Se aparecerem bolhas de ar na ponta da pipeta, o produto de teste é removido (expelido) e o processo é repetido até que a ponta seja preenchida sem bolhas de ar. Se necessário, uma seringa normal (sem agulha) pode ser usada, uma vez que permite medir o volume preciso da substância química em teste e permite a aplicação mais fácil à superfície epitelial da córnea. Após a dosagem, a janela de vidro é substituída na câmara anterior para recriar um sistema fechado.

Incubação pós-exposição

33. Após o período de exposição, a substância química em estudo, o controle negativo ou a substância de controle positivo são removidos da câmara anterior e o epitélio é lavado, pelo menos, três vezes (ou até não poderem ser observadas provas visuais da substância química em estudo) com EMEM (contendo fenol vermelho). O meio contendo fenol vermelho é usado para o enxágue, uma vez que uma mudança de cor no vermelho de fenol pode ser monitorada para determinar a eficácia do enxágue de materiais ácidos ou alcalinos. As córneas são lavadas mais de três vezes se o vermelho de fenol ainda estiver descolorido (amarelo ou púrpura), ou se a substância química de teste ainda estiver visível. Uma vez que o meio esteja livre de substância química de teste, as córneas recebem um enxágue final com EMEM (sem vermelho de fenol). O EMEM (sem fenol vermelho) é usado como um enxágue final para garantir a remoção do vermelho de fenol da câmara anterior antes da medição da opacidade. A câmara anterior é então reabastecida com EMEM fresco sem vermelho de fenol.

34. Para líquidos ou surfactantes, após o enxágue, as córneas são incubadas por mais duas horas a 32 ± 1°C. Tempo de pós-exposição mais longo pode ser útil em certas circunstâncias e pode ser considerado caso a caso. As córneas tratadas com sólidos são lavadas completamente no final do período de exposição de quatro horas, mas não requerem incubação adicional.

35. No final do período de incubação pós-exposição para líquidos e tensoativos e no final do período de exposição de quatro horas para sólidos não tensoativos, a opacidade e a permeabilidade de cada córnea são registradas. Além disso, cada córnea é observada visualmente e observações pertinentes são registradas (por exemplo, escamação de tecido, resíduo de substância química, padrões de opacidade não uniformes). Essas observações podem ser importantes, pois podem ser refletidas por variações nas leituras do opacitômetro.

Substâncias de Controle

36. Controles simultâneos negativos ou de solvente/veículo e controles positivos são incluídos em cada experimento.

37. Ao testar uma substância líquida a 100%, um controle negativo concomitante (solução de cloreto de sódio a 0,9% ou água destilada) é incluído no método de

teste BCOP para que alterações não específicas no sistema de teste possam ser detectadas e para fornecer uma linha de base para os pontos finais do ensaio. Também garante que as condições do ensaio não resultem inadequadamente em uma resposta irritante.

38. Quando se testa um líquido diluído, um agente tensoativo ou um sólido, é incluído um grupo de controle concorrente com solvente/veículo no teste BCOP, de modo que possam ser detectadas alterações não específicas no teste e proporcionar uma base para os parâmetros finais do ensaio. Apenas um solvente/veículo que tenha demonstrado não ter efeitos adversos no sistema de teste pode ser usado.

39. Inclui-se uma substância conhecida por induzir resposta positiva como um controle positivo simultâneo em cada experimento, para verificar a integridade do sistema de teste e sua conduta correta. No entanto, para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo possa ser avaliada ao longo do tempo, a magnitude da resposta irritativa não deve ser intensa demais.

40. Exemplos de controles positivos para substâncias químicas líquidas são 100% de etanol ou 100% de dimetilformamida. Um exemplo de controle positivo para substâncias químicas sólidas é imidazol a 20% p/v em solução de cloreto de sódio a 0,9%.

41. As substâncias de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de substâncias químicas desconhecidas, um produto em si ou de uma classe de produtos ou para avaliar o potencial relativo de um irritante ocular dentro de uma faixa específica de respostas de irritação.

Pontos de extremidade medidos

42. A opacidade é determinada pela quantidade de transmissão de luz através da córnea. A opacidade da córnea é medida, quantitativamente, com o auxílio de um opacitômetro, resultando em valores de opacidade medidos em uma escala contínua.

43. A permeabilidade é determinada pela quantidade de corante de fluoresceína de sódio que penetra em todas as camadas celulares da córnea (o epitélio na superfície externa da córnea, através do endotélio na superfície interna da córnea). Um mL de solução de fluoresceína de sódio (4 ou 5mg/mL ao testar líquidos e

surfactantes ou sólidos não surfactantes, respectivamente) é adicionado à câmara anterior do suporte da córnea, que faz interface com o lado epitelial da córnea, enquanto a câmara posterior, que interage com o lado endotelial da córnea, é preenchido com EMEM fresco. O suporte é então incubado na posição horizontal por 90 ± 5min a 32 ± 1°C. A quantidade de fluoresceína de sódio que atravessa a câmara posterior é medida, quantitativamente, com o auxílio da espectrofotometria UV/VIS. As medidas espectrofotométricas avaliadas a 490nm são registradas como densidade óptica (DO_{490}) ou valores de absorbância, que são medidos em uma escala contínua. Os valores de permeabilidade à fluoresceína são determinados utilizando valores de DO_{490}, com base num espectrofotómetro de luz visível utilizando um comprimento de percurso padrão de 1cm.

44. Alternativamente, pode ser utilizado um leitor de placas de microtitulação de 96 poços, desde que: (i) o intervalo linear do leitor de placas para determinar os valores da fluorescência DO_{490} possa ser estabelecido; e (ii) o volume correto de amostras de fluoresceína seja usado na placa de 96 poços, para resultar em valores de DO_{490} equivalentes ao comprimento de caminho padrão de 1cm (isso pode exigir um poço completamente completo – geralmente 360μL).

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação de dados

45. Uma vez que os valores de opacidade e permeabilidade média (DO_{490}) tenham sido corrigidos para valores de opacidade de fundo e permeabilidade de controle negativo de DO_{490}, os valores médios de opacidade e permeabilidade de DO_{490}, para cada grupo de tratamento, devem ser combinados em uma fórmula empírica, para calcular um Índice de Irritabilidade *In Vitro* (IVIS) para cada grupo de tratamento, como se segue:

$$\text{IVIS} = \text{valor médio da opacidade} + (15 \times \text{valor médio da permeabilidade } DO_{490})$$

46. Sina *et al.*[16] relataram que essa fórmula foi obtida durante estudos internos e interlaboratoriais. Os dados gerados para uma série de 36 compostos em um estudo multilaboratorial foram submetidos a uma análise multivariada, para determinar a equação de melhor ajuste entre os dados *in vivo* e *in vitro*. Cientistas de duas empresas separadas realizaram essa análise e derivaram equações quase idênticas.

47. Os valores de opacidade e permeabilidade também devem ser avaliados independentemente, para determinar se uma substância química de teste induziu corrosividade ou irritação severa através de apenas um dos dois pontos finais (ver Critérios de Decisão).

Critério de decisão

48. Os valores-limite do IVIS para identificação de substâncias químicas de teste como indutores de lesões oculares graves (UN GHS Categoria 1) e substâncias químicas de teste que não exigem classificação para irritação nos olhos ou dano ocular grave (UN GHS Sem Categoria) são dados a seguir:

IVIS	UN GHS
≤ 3	Sem Categoria
$>3; \leq 55$	Nenhuma previsão pode ser feita
>55	Categoria 1

Critérios de Aceitação do Estudo

49. Um teste é considerado aceitável se o controle positivo der um IVIS dentro de dois desvios padrão da média histórica atual, a qual deve ser atualizada, pelo menos, a cada três meses – ou cada vez que um teste aceitável for conduzido em laboratórios, onde os testes são realizados com pouca frequência (menos de uma vez por mês). As respostas negativas ou de controle do solvente/veículo devem resultar em valores de opacidade e permeabilidade inferiores aos limites superiores estabelecidos para valores de opacidade e permeabilidade de fundo para córneas bovinas, tratadas com o respectivo controle negativo ou solvente/veículo. Uma única execução de teste, composta por três córneas, pelo menos, deve ser suficiente quando a classificação obtida para a substância química resultante for inequívoca. No entanto, nos casos de resultados limítrofes no primeiro teste, um segundo teste deve ser considerado (mas não necessariamente obrigatório), assim como um terceiro, no caso de resultados IVIS médios discordantes entre os dois primeiros testes. Neste contexto, um resultado no primeiro teste é considerado limítrofe se as previsões das três córneas forem não concordantes, de forma que:

- 2 das 3 córneas deram previsões discordantes da média de todas as 3 córneas; ou
- 1 das 3 córneas forneceu uma predição discordante da média de todas as 3 córneas, e o resultado discordante foi >10 unidades IVIS do limiar de corte de 55;

- Se a repetição do teste corroborar a previsão do teste inicial (com base no valor médio do IVIS), então, uma decisão final pode ser tomada sem testes adicionais. Se a repetição do teste resultar em uma previsão não concordante do teste inicial (com base no valor médio do IVIS), um terceiro e último teste deve ser conduzido, para resolver previsões equivocadas e para classificar a substância química em teste. Pode ser admissível realizar mais testes de classificação e rotulagem no caso de qualquer teste resultar em uma previsão da Categoria 1 do UN GHS.

Relatório de teste

50. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações, se relevantes para a condução do estudo:

Substâncias químicas e substâncias de teste

- Nome(s) químico(s), como o nome estrutural utilizado pelo Chemical Abstracts Service (CAS), seguido de outros nomes, se conhecidos; número de registro CAS (RN), se conhecido
- Pureza e composição da substância ou preparação de ensaio/controle (em percentagem (m) em peso), na medida em que esta informação esteja disponível
- Propriedades físico-químicas, como estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, classe química, solubilidade em água, relevantes para a realização do estudo
- Tratamento das substâncias de teste/controle antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
- Estabilidade, se conhecida

Informações sobre o patrocinador e a instalação de teste

- Nome e endereço do patrocinador, instalação de teste e diretor de estudo

Condições do Método de Teste

- Opacitômetro utilizado (por exemplo, modelo e especificações) e configurações do instrumento
- Informação de calibração para dispositivos usados para medir a opacidade e a permeabilidade (opacitômetro e espectrofotômetro) para garantir a linearidade das medições

- Tipo de suportes de córnea usados (por exemplo, modelo e especificações)
- Descrição de outros equipamentos utilizados
- O procedimento usado para garantir a integridade (ou seja, precisão e confiabilidade) do método de teste ao longo do tempo (testes periódicos de substâncias químicas de proficiência)

Critérios para um teste aceitável

- Intervalos de controles positivo e negativo simultâneos aceitáveis com base em dados históricos
- Se aplicável, intervalos de controle de benchmark concorrentes aceitáveis baseados em dados históricos

Coleta e Preparação de Olhos

- Identificação da fonte dos olhos (isto é, a instalação da qual eles foram coletados)
- Diâmetro da córnea, como medida de idade do animal e adequação para o ensaio
- Condições de armazenamento e transporte dos olhos (data e hora da coleta do olho, intervalo de tempo antes do início do teste, meios de transporte e condições de temperatura, quaisquer antibióticos usados)
- Preparação e montagem das córneas bovinas, incluindo declarações sobre qualidade, temperatura dos porta-corneais e critérios de seleção de córneas usadas para testes

Procedimento de teste

- Número de repetições utilizadas
- Identidade dos controles negativos e positivos utilizados (se aplicável, também os controles de solvente e benchmark)
- Concentrações das substâncias químicas em teste, tempo de exposição e tempo de incubação pós-exposição utilizado
- Descrição dos critérios de avaliação e decisão utilizados
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados
- Descrição de quaisquer modificações do procedimento de teste
- Descrição dos critérios de decisão utilizados

Resultados

- Tabulação de dados de amostras de teste individuais (por exemplo, valores de opacidade e DO_{490} e IVIS calculado para o teste químico e os controles positivo, negativo e de referência [se incluído], relatados em forma tabular, incluindo dados de repetições repetidas, conforme apropriado, e significado ± o desvio padrão para cada experimento)
- Descrição de outros efeitos observados
- A classificação derivada *in vitro* da UN GHS, se aplicável

Discussão dos Resultados

Conclusões

LITERATURA

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication Nº 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm].

(3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, Nº 189, OECD, Paris.

(4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html].

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker,

U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. Toxicol. *in Vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication Nº: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication Nº: 10-7553A. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm].

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. Fundam. Appl. Toxicol. 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicol. in Vitro 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. Reg. Tox. Pharmacol. 36:106-117.

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection

of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, Nº 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughter house. Can. J. Zool. 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. Fundam. Appl. Toxicol. 26:20-31.

(17) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/ corrosion. Available: [http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Nº 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17. Available: [http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html]

(20) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment Nº 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ANEXO 1

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de "relevância". O termo é frequentemente usado de forma

intercambiável com “concordância”, para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste.

Substância de referência: uma substância usada como padrão para comparação com uma substância química de teste. Uma substância de referência deve ter as seguintes propriedades: (i) uma fonte consistente e confiável; (ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias testadas; (iii) características físico-químicas conhecidas; (iv) dados de suporte sobre efeitos conhecidos; e (v) potência conhecida no intervalo da resposta desejada.

Abordagem Bottom-Up: abordagem passo a passo usada para uma substância química suspeita de não requerer classificação para irritação nos olhos ou dano ocular grave, que começa com a determinação de substâncias químicas que não exigem classificação (resultado negativo) de outras substâncias químicas (resultado positivo).

Córnea: a parte transparente da frente do globo ocular que cobre a íris e a pupila e admite a luz para o interior.

Opacidade da córnea: medição da extensão da opacidade da córnea após a exposição a uma substância química em teste. O aumento da opacidade da córnea é indicativo de danos na córnea. A opacidade pode ser avaliada subjetivamente, como feita no teste do olho de coelho de Draize, ou objetivamente, com um instrumento como um “opacitômetro”.

Permeabilidade da córnea: medição quantitativa do dano ao epitélio da córnea pela determinação da quantidade de corante de fluoresceína sódica que passa por todas as camadas celulares da córnea.

Irritação ocular: produção de alterações no olho após a aplicação de uma substância química em teste na superfície anterior do olho; são alterações totalmente reversíveis dentro de 21 dias após a aplicação. Intercambiável com “efeitos reversíveis no olho” e com “UN GHS Categoria 2”[4].

Taxa de falso negativo: a proporção de todas as substâncias positivas falsamente identificadas por um método de teste como negativas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Taxa de falsos positivos: a proporção de todas as substâncias negativas que são falsamente identificadas por um método de teste como positivas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Risco: propriedade inerente de um agente ou situação que tem o potencial de causar efeitos adversos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto a esse agente.

Índice de Irritação In Vitro (IVIS): fórmula derivada empiricamente, usada no método de teste BCOP em que os valores médios de opacidade e permeabilidade média para cada grupo de tratamento são combinados em uma única pontuação in vitro para cada grupo de tratamento. O IVIS = valor médio de opacidade + (15 x valor médio de permeabilidade).

Efeitos irreversíveis no olho: ver "lesões oculares graves".

Mistura: uma mistura ou solução composta de duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem[4].

Controle negativo: uma réplica não tratada contendo todos os componentes de um sistema de teste. Esta amostra é processada com amostras tratadas com substâncias químicas de teste e outras amostras de controle para determinar se o solvente interage com o sistema de teste.

Não classificado: substâncias químicas que não são classificadas para irritação ocular (Categoria 2, 2A ou 2B do GHS) ou lesões oculares graves (Categoria 1 do GHS). Intercambiável com "UN GHS Sem Categoria".

Opacitômetro: um instrumento usado para medir a "opacidade da córnea", por meio da avaliação quantitativa da transmissão de luz através da córnea. O instrumento típico tem dois compartimentos, cada um com sua própria fonte de luz e fotocélula. Um compartimento é usado para a córnea tratada, enquanto o outro é usado para calibrar e zerar o instrumento. A luz de uma lâmpada de halogênio é enviada através de um compartimento de controle (câmara vazia, sem janelas ou líquido) para uma fotocélula e comparada à luz enviada através do compartimento experimental, que abriga a câmara contendo a córnea, para uma fotocélula. A diferença na transmissão de luz das fotocélulas é comparada e um valor numérico de opacidade é apresentado em um mostrador digital.

Controle positivo: um replicado contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância química conhecida por induzir uma resposta positiva. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser intensa demais.

Efeitos reversíveis no olho: ver "irritação nos olhos".

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado replicavelmente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, usando o mesmo protocolo. Avalia-se calculando as reprodutibilidades intra e interlaboratorial e a replicabilidade intralaboratorial.

Lesões oculares graves: produção de danos nos tecidos oculares ou grave decaimento físico da visão, após a aplicação de uma substância química teste na superfície anterior do olho, que não seja totalmente reversível dentro de 21 dias da aplicação. Intercambiável com "efeitos irreversíveis no olho" e com "UN GHS Categoria 1"[4].

Solvente/veículo controle: uma amostra não tratada contendo todos os componentes de um sistema de teste, incluindo o solvente ou veículo, que é processada com as amostras tratadas com a substância química de teste e outras amostras de controle para estabelecer a resposta de linha de base para as amostras tratadas com a substância química de teste, dissolvida no mesmo solvente ou veículo. Quando testada com um controle negativo concorrente, essa amostra também demonstra se o solvente ou o veículo interage com o sistema de teste.

Substância: elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo usado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou sem alterar a sua composição[4].

Surfactante: também chamado agente ativo de superfície, é uma substância, como um detergente, que pode reduzir a tensão superficial de um líquido e, assim, permitir que ele espume ou penetre nos sólidos; também é conhecido como agente umectante.

Mistura contendo surfactante: no contexto desta diretriz, é uma mistura contendo um ou mais surfactantes na concentração final >5%.

Abordagem de cima para baixo: abordagem passo a passo usada para uma substância química suspeita de causar dano ocular grave, que começa com a determinação de substâncias químicas que induzem danos oculares graves (resultado positivo) de outras substâncias químicas (resultado negativo).

Substância química de ensaio: substância química (substância ou mistura) avaliada no método de ensaio.

Estratégia escalonada de teste: uma estratégia de teste em camadas, na qual todas as informações existentes sobre uma substância química de teste são revisadas, em uma ordem especificada, usando um processo baseado em evidência em cada camada, para determinar se há informações suficientes disponíveis para uma decisão de classificação de risco, antes da progressão para o próximo nível. Se o potencial de irritação de uma substância química em teste puder ser atribuído com base nas informações existentes, nenhum teste adicional é necessário. Se o potencial de irritação de uma substância química de teste não puder ser atribuído com base nas informações existentes, um procedimento de teste em animais sequencial por etapas será realizado, até que uma classificação inequívoca possa ser feita.

Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas das Nações Unidas (GHS da ONU): sistema que propõe a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas), de acordo com os tipos e os níveis padronizados de riscos físicos, de saúde e ambientais e elementos de comunicação, tais como pictogramas, palavras-sinal, declarações de perigo, declarações de precaução e fichas de dados de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o meio ambiente[4].

UN GHS Categoria 1: ver “lesões oculares graves”.

Categoria GHS da ONU[2]: ver “irritação nos olhos”.

UN GHS Sem Categoria: substâncias químicas que não atendem aos requisitos para classificação como UN GHS Categoria 1 ou 2 (2A ou 2B). Intercambiável com "Não classificado".

Método de teste validado: um método de teste para o qual estudos de validação foram concluídos para determinar a relevância (incluindo precisão) e a confiabilidade para um propósito específico. É importante observar que um método de teste validado pode não ter desempenho suficiente em termos de precisão e confiabilidade para ser considerado aceitável para o propósito proposto.

Baseado em evidência: o processo de considerar os pontos fortes e fracos de várias informações para alcançar e apoiar uma conclusão sobre o potencial de risco de uma substância química em teste.

ANEXO 2

Capacidade preditiva do método de teste BCOP

Sistema de Classificação	Nº.	Precisão		Sensibilidade		Falso Negtivo		Especificidade		Falso Positivo	
		%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.
UN GHS EU CLP	191	78.53	150/191	86.15	56/65	13.85	9/65	74.60	94/126	25.40	32/126
US EPA	190	78.95	150/190	85.71	54/63	14.29	9/63	75.59	96/127	24.41	31/127

Tabela 1: Capacidade preditiva do BCOP para identificar substâncias químicas que provocam danos oculares graves [GHS da UN / UE CLP Cat 1 vs Not Cat 1 (Cat 2 + Sem Cat); US EPA Cat I vs Não Cat I (Cat II + Cat III + Cat IV)]

Sistema de Classificação	Nº.	Precisão		Sensibilidade		Falso Negativo		Especificidade		Falso Positivo	
		%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.
UN GHS EU CLP	196	68.88	135/196	100	107/107	0	0/107	31.47	28/89	68.54	61/89
US EPA	190	82.11	156/190	93/15	136/146	6.75	10/146	45.45	20.44	54.44	24/44

Tabela 2: Capacidade preditiva do BCOP para identificar substâncias químicas que não exigem classificação para irritação dos olhos ou lesões oculares graves ("não irritantes") [GHS da EU / EU CLP No Cat vs Not No Cat (Cat 1 + Cat 2); Cat IV EPA dos EUA vs Cat não IV (Cat I + Cat II + Cat III)]

ANEXO 3

Proficiência química para o método de teste BCOP

Antes do uso rotineiro de um método de teste que atenda a esta diretriz, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica ao identificar corretamente a classificação de risco ocular das 13 substâncias recomendadas na tabela 1. Essas substâncias foram selecionadas, para representar a faixa de respostas para riscos ao olho, baseando-se em resultados do teste do olho de coelho *in vivo* (TG 405)[17] e do sistema de classificação UN GHS (ou seja, Categorias 1, 2A, 2B, ou Não classificados)[4]. Outros critérios de seleção foram: as substâncias estão disponíveis comercialmente e há dados de referência *in vivo* e *in vitro* de alta qualidade disponíveis no método de teste BCOP. Os dados de referência estão disponíveis no Documento Resumido Simplificado[3] e no Documento de Revisão do ICCVAM para o método de teste BCOP[2,18].

Tabela 1: Substâncias recomendadas para demonstrar proficiência técnica com o método de teste BCOP

Produto Químico	CASRN	Classe Química[1]	Estado físico	Classificação *in vivo*[2]	Classificação BCOP
Cloreto de benzalcônio (5%)	8001-54-5	Composto Onio	Líquido	Categoria 1	Categoria 1
Clorexidina	55-56-1	Amina, amidina	Sólido	Categoria 1	Categoria 1
Ácido dibenzoil-L-tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, Ester	Sólido	Categoria 1	Categoria 1
Imidazoli	288-32-4	Heterocíclico	Sólido	Categoria 1	Categoria 1
Ácido tricloroacético (30%)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquido	Categoria 1	Categoria 1
Cloreto de 2,6-diclorobenzoílo	4659-43-4	Halogeneto de acilo	Líquido	Categoria 2A	Previsão não precisa/ confiável
Etil-2-metilacetoacetato	609-14-3	Cetona, Ester	Líquido	Categoria 2B	Previsão não precisa/ confiável

Produto Químico	CASRN	Classe Química[1]	Estado físico	Classificação *in vivo*[2]	Classificação BCOP
Nitrato de amônio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólido	Categoria 2[3]	Previsão não precisa/ confiável
EDTA, sal di-potássico	25102-12-9	Amina, ácido carboxílico (sal)	Sólido	Não classificado	Não classificado
Polissorbato 20	9005-64-5	Ester, polieter	Líquido	Não classificado	Não classificado
2-Mercaptopirimidina	1450-85-7	Halogeneto de acilo	Sólido	Não classificado	Não classificado
Fenilbutazona	50-33-9	Heterocíclico	Sólido	Não classificado	Não classificado
Éter laurílico de polioxietileno 23 (BRIJ-35) (10%)	9002-92-0	Álcool	Líquido	Não classificado	Não classificado

Abreviações: CASRN = Número de registro do Chemical Abstracts Service.

[1] As classes químicas foram atribuídas a cada substância química de teste usando-se um esquema de classificação padrão, baseado no sistema de classificação Medical Subject Headings (MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina (disponível em http://www.nlm.nih.gov/ mesh).

[2] Com base nos resultados do teste do olho de coelho in vivo (OECD Diretriz 405)[17] e utilizando o GHS[4].

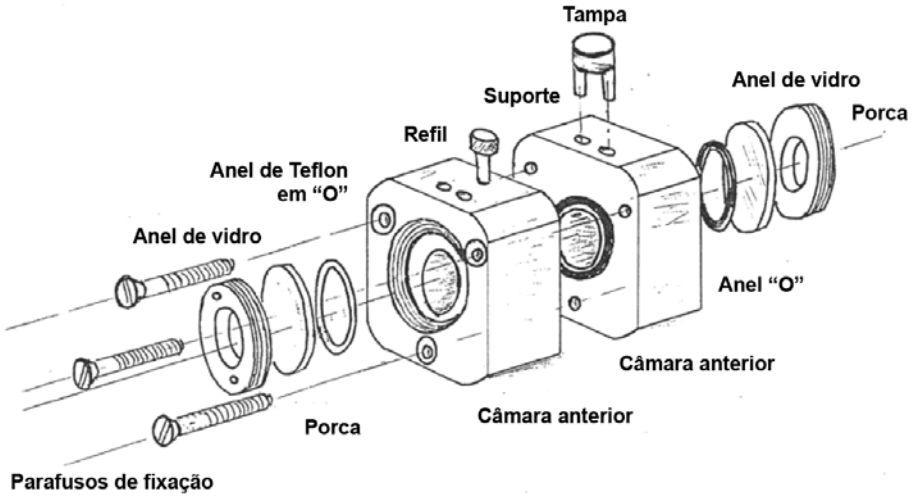
[3] Classificação como 2A ou 2B depende da interpretação do critério do GHS para distinguir entre essas duas categorias, ou seja, 1 de 3 vs 2 de 3 animais com efeitos no dia 7 necessários para gerar uma classificação de Categoria 2A. O estudo in vivo incluiu 3 animais. *Todos os extremos para além da vermelhidão conjuntiva num animal se recuperaram para uma pontuação de zero no dia 7 ou anterior. O único animal que não se recuperou totalmente no dia 7 teve uma pontuação de vermelhidão conjuntiva de 1 (no dia 7) que se recuperou totalmente no dia 10.*

ANEXO 4

O suporte corneal do BCOP

1. Os suportes corneais de BCOP são feitos de um material inerte (polipropileno). Os suportes são compostos de duas metades (uma câmara anterior e poste-

rior) e possuem duas câmaras internas cilíndricas semelhantes. Cada câmara é projetada para conter o volume de cerca de 5mL e termina em uma janela de vidro, através da qual as medições de opacidade são registradas. Cada uma das câmaras internas tem 1,7cm de diâmetro e 2,2cm de profundidade[1]. Um anel "O" localizado na câmara posterior é usado para evitar vazamentos. As córneas são colocadas com o lado endotelial para baixo, no anel das câmaras posteriores, e as câmaras anteriores são colocadas sobre o lado epitelial das córneas. As câmaras são mantidas no lugar por três parafusos de aço inoxidável, localizados nas bordas externas da câmara. O final de cada câmara abriga uma janela de vidro, que pode ser removida para facilitar o acesso à córnea. Um anel "O" também está localizado entre a janela de vidro e a câmara para evitar vazamentos. Dois orifícios no topo de cada câmara permitem a introdução e a remoção do meio e dos compostos de teste. Eles são fechados com tampas de borracha durante os períodos de tratamento e incubação. A transmissão de luz através dos suportes da córnea pode mudar potencialmente, uma vez que os efeitos do desgaste ou do acúmulo de resíduos químicos específicos nos furos internos da câmara ou nas janelas de vidro podem afetar a dispersão ou a refletância da luz. Como consequência, poderia haver aumentos ou decréscimos na transmissão de luz de linha de base (e inversamente nas leituras de opacidade da linha de base) através dos suportes de córnea, podendo interferir nas medições de opacidade inicial da córnea esperadas em câmaras individuais (isto é, os valores iniciais de opacidade da córnea em suportes individuais específicos de córnea podem diferir em mais de 2 ou 3 unidades de opacidade dos valores de referência esperados). Cada laboratório deve considerar o estabelecimento de um programa para avaliar as mudanças na transmissão de luz através dos suportes de córnea, dependendo da natureza das químicas testadas e da frequência de uso das câmaras. Para estabelecer valores de referência, os suportes de córnea podem ser verificados antes do uso de rotina, medindo os valores de opacidade da linha de base (ou transmissão de luz) de câmaras preenchidas com meio completo, sem córneas. Os suportes de córnea devem ser periodicamente verificados quanto a mudanças na transmissão de luz durante os períodos de uso. Cada laboratório pode estabelecer a frequência para checar os portadores de córnea, com base nas químicas testadas, na frequência de uso e nas observações de mudanças nos valores de opacidade da córnea na linha de base. Se mudanças importantes na transmissão da luz, através dos suportes da córnea, forem observadas, procedimentos apropriados de limpeza e/ou polimento da superfície interna dos suportes da córnea ou a substituição devem ser considerados.



[1] *As dimensões fornecidas baseiam-se em um suporte para córnea que é usado para vacas com idade entre 12 e 60 meses. No caso de animais com 6 a 12 meses, o suporte que ser concebido de tal forma que cada câmara detenha o volume de 4mL e cada uma das câmaras internas seja de 1,5cm de diâmetro e 2,2cm de profundidade. Com qualquer suporte de córnea recém-projetado, é muito importante que a relação entre a área de superfície da córnea exposta e o volume da câmara posterior seja a mesma que a relação no suporte de córnea tradicional. Isso é necessário para assegurar que os valores de permeabilidade sejam corretamente determinados para o cálculo do IVIS pela fórmula proposta.*

Adotado: 25 de Junho de 2018

Diretriz OECD para o ensaio de substâncias químicas - 438

Método de teste ocular isolado da galinha, para identificar: I) substâncias químicas que provocam lesões oculares graves e II) substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves

INTRODUÇÃO

1. O método de ensaio Ocular de Frango Isolado (ICE) foi avaliado pelo Comitê de Coordenação Interinstitucional para Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM), em conjunto com o Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) e com o Centro Japonês de Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM), em 2006 e 2010[1-3]. Na avaliação original, o ICE foi aprovado como um método de ensaio cientificamente válido para uso como um teste de triagem para identificar substâncias químicas (substâncias e misturas) que induziriam lesões oculares graves (Categoria 1), conforme definido pelo Sistema Globalmente Harmonizado das Nações Unidas (ONU), Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS)[1-2;4]. Uma reavaliação do conjunto de dados *in vitro* e *in vivo*, utilizada no estudo de validação, concluiu que o método de teste ICE também poderia ser usado para identificar substâncias químicas que não exigissem classificação para irritação ocular e lesões oculares graves, conforme definido pelo GHS da ONU, o que levou à versão da Diretriz 438 adotada em 2013[4-5]. Desde então, os Critérios de Decisão utilizados para identificar substâncias químicas que não exigem classificação, de acordo com o Sistema de Classificação do GHS da ONU, foram revisados com base nos mais recentes padrões de aceitação[5-8]. Além disso, a histopatologia têm tem se mostrado um ponto de término adicional útil para identificar detergentes e surfactantes de pH não-extremos ($2 < ph < 11,5$) da Categoria 1 do GHS[9-10]. Esta Diretriz de Teste (adotada em 2009 e atualizada em 2013 e em 2018) inclui os últimos usos e limitações recomendados do método de teste ICE com base nessas avaliações.

2. Atualmente, estima-se que, num futuro próximo, nenhum teste de irritação ocular *in vitro* será capaz de substituir totalmente o teste ocular de Draize *in vivo*, para prever toda a gama de irritação em diferentes classes químicas. No entanto, combinações engenhosas de métodos de teste alternativos, dentro de uma estratégia (em camadas) e/ou Abordagens Integradas de Testes e Avaliação (AITA) podem

ser capazes de substituir o teste ocular de Draize[7;11]. A abordagem Top-Down (de cima para baixo) foi projetada para ser usada quando, com base nas informações existentes, espera-se que uma substância química tenha alto potencial de irritação, enquanto a abordagem Bottom-Up (de baixo para cima) foi projetada para ser usada quando, com base nas informações existentes, não se espera que uma substância química cause irritação ocular suficiente para exigir uma classificação[7;11]. O método de teste ICE é um método *in vitro* que pode ser usado, sob certas circunstâncias e com limitações específicas, conforme descrito nos parágrafos 7 a 11, para classificação e rotulagem de substâncias químicas com risco ocular. Embora não seja considerado válido como um substituto independente para o teste ocular de coelho *in vivo*, o método de teste ICE é recomendado como uma etapa inicial dentro de uma estratégia de teste, como a abordagem Top-Down, recomendada na OECD TG 263[7], para identificar substâncias químicas que causam danos oculares graves, ou seja, substâncias químicas a serem classificadas como Categoria 1 do GHS, da ONU sem mais testes[4]. O método de teste ICE também é recomendado para identificar substâncias químicas que não exigem classificação para irritação nos olhos ou lesões oculares graves, conforme definido pelo GHS da ONU (Sem Categoria)([4], e pode, portanto, ser usado como um passo inicial dentro de uma estratégia de teste (OECD TG 263)[7]. Contudo, uma substância química que não esteja prevista como causadora de dano ocular grave, isto é, não classificada para irritação ocular/ dano ocular grave, com o método de teste ICE, seriam necessárias informações adicionais para se estabelecer uma classificação definitiva. A escolha do(s) método(s) mais adequado(s) e a utilização desta diretriz devem ser vistos no contexto do Documento de Orientação da OECD sobre uma Abordagem Integrada de Ensaio e Avaliação de Danos Oculares e Irritação Ocular[7]. As autoridades regulatórias devem ser consultadas antes de se usar o método de teste ICE, em uma abordagem Bottom-Up, para esquemas de classificação diferentes do GHS da ONU.

3. O objetivo desta diretriz é descrever os procedimentos usados para avaliar o potencial de risco ocular de uma substância química em teste, conforme medido por sua capacidade de induzir ou não a toxicidade nos olhos enucleados do frango. Os efeitos tóxicos na córnea são medidos por: (i) uma avaliação qualitativa da opacidade; (ii) uma avaliação qualitativa do dano ao epitélio, com base na aplicação de fluoresceína no olho (retenção de fluoresceína); (iii) uma medição quantitativa do aumento da espessura (edema); e (iv) uma avaliação qualitativa do dano morfológico macroscópico na superfície ocular tratada. As avaliações

da de opacidade, edema e dano da córnea após a exposição a uma substância química em teste são avaliadas individualmente e depois combinadas para obter -se uma classificação de irritação ocular. Entretanto, as observações histopatológicas também podem ser usadas como um ponto final adicional, para potencialmente melhorar a previsão de detergentes e surfactantes de pH não extremo (2<pH <11,5) da categoria 1 do GHS da UN (ver parágrafos 8 e 56).

4. As definições são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

5. Esta Diretriz de Teste baseia-se no protocolo sugerido no Documento de Orientação 160[12] da OECD, que foi originalmente adotada em 2011 e atualizada em 2017 e 2018. O protocolo é baseado em informações obtidas em demais protocolos publicados[13-17].

6. Uma ampla lista de substâncias químicas foi testada na avaliação subjacente a esta Diretriz de Teste. A base de dados global, atualmente tem de 184 substâncias químicas, incluindo 75 substâncias e 109 misturas[5]. A Diretriz de Teste é aplicável a sólidos, líquidos, emulsões e géis. Os líquidos podem ser aquosos ou não aquosos; os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Gases e aerossóis ainda não foram avaliados em um estudo de validação.

7. O método de teste ICE pode ser usado para identificar substâncias químicas que causem danos oculares graves, ou seja, substâncias químicas a serem classificadas como Categoria 1 do GHS da ONU[4]. Quando utilizadas para esse fim, as limitações identificadas para o método de teste ICE são baseadas nas altas taxas de falso positivo para álcoois e nas altas taxas de falso negativo para sólidos e surfactantes[1;3;18]. Todavia, as substâncias químicas em teste, que induzem efeitos persistentes não graves *in vivo*, também podem incorrer em risco de subestimação[22]. No entanto, as taxas de falso negativo neste contexto (Categoria 1 do GHS da ONU, identificadas como não pertencentes à Categoria 1 do GHS da ONU) não são críticas, pois todas as substâncias químicas negativas serão posteriormente testadas com outros testes *in vitro*, adequadamente validadas, ou, como última opção, testadas em coelhos, dependendo dos requisitos regulatórios, usando uma estratégia de teste sequencial, em uma abordagem baseada em evidência. Além disso, a histopatologia foi considerada um parâmetro adicio-

nal útil para diminuir as taxas de falso negativo, quando usada para identificar os detergentes de pH não extremo (2<pH <11,5), da Categoria 1 do GHS, e surfactantes, que induzem principalmente efeitos persistentes e não severos *in vivo*[9-10;19]. Em relação aos sólidos, deve-se notar que estes podem levar a condições de exposição variáveis e extremas no teste de irritação ocular de Draize *in vivo*, o que pode resultar em predições irrelevantes do seu real potencial de irritação[20]. Os investigadores podem considerar o uso deste método de teste para todos os tipos de substâncias químicas, pelo qual um resultado positivo deve ser aceito como indicativo de dano ocular grave, isto é, na classificação UN GHS Categoria 1, sem testes adicionais. Contudo, os resultados positivos obtidos com álcoois devem ser interpretados com cautela, devido ao risco de superestimação.

8. Quando usado para identificar substâncias químicas que causam danos oculares graves (UN GHS Categoria 1), o método de teste ICE (sem uso de histopatologia) tem uma precisão global de 83% (142/172), uma taxa de falso positivo de 7% (9/127) e uma taxa de falso negativo de 47% (21/45), quando comparados com dados do método ocular do coelho *in vivo*, classificados de acordo com o sistema de classificação do GHS da ONU[4-5]. Quando a histopatologia é considerada como um ponto adicional para identificar detergentes e surfactantes de pH não-extremos (2<pH <11,5) do pH do GHS da Categoria 1, a taxa de falsos negativos do método de teste ICE e sua precisão são melhorados (de 64% para 27%), falsos negativos (n=22) e 53% a 77% de precisão (n=30), enquanto uma taxa de falso positivo aceitável é mantida (de 0% a 12,5% de falso-positivos (n=8))[10].

9. O método de teste ICE também pode ser usado para identificar substâncias químicas que não exijam classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves sob o sistema de classificação GHS da ONU[4]. O método de teste pode ser usado para todos os tipos de substâncias químicas, pelo qual um resultado negativo pode ser aceito por não classificar uma substância química para irritação nos olhos e lesões oculares graves. No entanto, com base em um resultado do banco de dados de validação, as tintas contendo solvente orgânico anti-incrustantes podem ser subestimadas[5].

10. Ao ser usado para identificar substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular e lesões oculares graves, o método de teste ICE têm tem uma precisão geral de 88% (161/184), uma taxa de falsos positivos de 24% (20/83), e uma taxa de falso negativo de 3% (3/101), quando comparado com

dados do método do teste ocular do coelho *in vivo*, classificados de acordo com o GHS da ONU[4-5]. Quando substâncias químicas de teste dentro de certas classes (tintas contendo solvente orgânico anti-incrustante) são excluídas do banco de dados, a precisão do método de teste ICE é de 88% (159/181), a taxa de falso positivo, 24% (20/83), e a taxa de falsos negativos de 2% (2/99), para o sistema de classificação do GHS da ONU[4].

11. O método de teste ICE não é recomendado para a identificação de substâncias químicas que devam ser classificadas como irritantes oculares (por exemplo, UN GHS Categoria 2 ou Categoria 2A) ou substâncias químicas que devam ser classificadas como levemente irritantes oculares (UN GHS Categoria 2B) devido ao número considerável de substâncias químicas da categoria 1 do GHS da ONU classificados como GHS da ONU, categoria 2, 2A ou 2B e GHS da ONU, não são classificados como Categoria GHS, Categoria 2, 2A ou 2B. Para este propósito, mais informações e, se necessário, testes adicionais com outro método adequado podem ser necessários.

12. Todos os procedimentos oculares realizados com frango devem seguir os regulamentos geográficos aplicáveis e, os procedimentos da instalação de teste para o manuseio de materiais humanos ou derivados de animais, que incluem, mas não estão limitados a, tecidos e fluidos de tecidos. Precauções laboratoriais universais são recomendadas[21].

13. Embora o método de teste ICE não aborde diretamente as lesões conjuntivais e iridiais, avaliadas no método do teste de irritação ocular no coelho, ele aborda os efeitos da córnea, que são os principais direcionadores da classificação *in vivo* quando se considera a Classificação do GHS da ONU. A este respeito, deve-se notar que os efeitos na íris são de menor importância para a classificação de substâncias químicas de acordo com o GHS da ONU[8;22]. Embora a reversibilidade das lesões da córnea não possa ser avaliada *per se* no método de teste ICE, foi demonstrado que as observações histopatológicas podem ajudar a identificar substâncias químicas que causam efeitos irreversíveis não relacionados com lesões iniciais de alto nível, como aquelas causadas por valores de pH não extremos ($2 < pH < 11,5$)[9]. Finalmente, o método de teste ICE não permite uma avaliação do potencial de toxicidade sistêmica associada à exposição ocular.

14. Esta diretriz de teste será atualizada periodicamente, conforme novas infor-

mações e dados sejam considerados. Por exemplo, dados histopatológicos adicionais podem se tornar disponíveis para substâncias químicas em teste, que não sejam detergentes e surfactantes de pH não-extremo. Para avaliar essa possibilidade, os usuários são encorajados a preservar os olhos e preparar amostras histopatológicas que podem ser usadas para desenvolver um banco de dados e critérios de decisão que melhorem ainda mais a precisão deste método de teste. A OECD desenvolveu o Documento de Orientação 160, que deve ser considerado ao se utilizar dos métodos de teste de toxicidade ocular *in vitro* do ICE e BCOP, que inclui procedimentos detalhados sobre a coleta e o processamento de amostras de histopatologia para avaliação[12].

DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA

15. Para qualquer laboratório que estabeleça inicialmente o método de teste padrão ICE, as substâncias químicas de proficiência, fornecidas no anexo 2, devem ser usadas. Um laboratório pode usar essas substâncias químicas para demonstrar sua competência técnica na execução do método padrão de teste ICE antes de enviar dados ICE para fins de classificação regulatória de risco. Para qualquer laboratório disposto a estabelecer a histopatologia da ICE para a classificação de risco regulatório de detergentes e tensoativos de pH não-extremo, o Atlas ICE e as recomendações fornecidas dentro da OECD TG 160 atualizada, devem ser usados[12]. Treinamento consolidado, portabilidade e avaliação de proficiência são recomendados para assegurar observações histopatológicas harmonizadas, consistentes e reprodutíveis. Além disso, uma revisão interna de patologia deve ser conduzida, de acordo com as recomendações atuais[23] e, de acordo com o documento consultivo da OECD nº 16 sobre os requisitos das BPL para a revisão por pares da histopatologia[24], e como descrito no parágrafo 50. Esse processo de revisão por pares permite verificar e melhorar a precisão e a qualidade dos diagnósticos e das interpretações da patologia. Finalmente, os químicos de proficiência fornecidos no anexo 3 devem ser utilizados para um laboratório demonstrar competência técnica na classificação dos efeitos histopatológicos da ICE, antes de submeter os dados para a classificação de risco regulamentar de detergentes e tensoativos de pH não-extremo.

PRINCÍPIO DO TESTE

16. O método de teste ICE é um modelo organotípico que fornece, em curto prazo, a manutenção ocular da galinha *in vitro*. Neste método de teste, o dano pela subs-

tância química é avaliado pela determinação do edema da córnea, da opacidade e da retenção de fluoresceína. Além disso, a histopatologia pode ser usada para aumentar a sensibilidade do método para a identificação de detergentes e surfactantes de pH não-extremo (2<pH <11,5) da Categoria 1 do GHS da ONU[10]. Embora a medição do edema da córnea forneça uma avaliação quantitativa, a opacidade da córnea, a retenção de fluoresceína e as alterações histopatológicas envolvem, separadamente, uma avaliação qualitativa. Cada medição é convertida em uma pontuação quantitativa, usada para atribuir uma Classe ICE (I a IV), ou atribuída a uma categorização qualitativa usada para definir uma classificação de risco ocular *in vitro*, como UN GHS Categoria 1 ou como UN GHS Sem Categoria (ver Critérios de decisão). Entretanto, nenhuma previsão pode ser feita para substâncias químicas não identificadas como Categoria 1 do GHS da ONU ou como Sem Categoria no GHS da ONU com o método de teste ICE (ver parágrafo 11). Nesses casos, o resultado "Nenhuma previsão pode ser feita" do teste ICE exigiria informações adicionais para fins de classificação [ver[7] para orientação].

Fonte e Idade dos Olhos do Frango

17. Historicamente, olhos de frangos coletados nos matadouros, mortos para consumo humano, são usados para este ensaio, eliminando a necessidade de animais de laboratório. Apenas os olhos de animais saudáveis, considerados adequados para entrar na cadeia alimentar humana, são utilizados.

18. Embora não tenha sido realizado um estudo controlado para avaliar o estado, dos frangos, a idade e o peso das galinhas utilizadas historicamente neste método de teste, as aves são de matadouro (isto é, aproximadamente, 7 semanas de idade, 1,5 - 2,5kg).

Coleta e Transporte de Olhos para o Laboratório

19. As cabeças devem ser removidas imediatamente após o atordoamento das aves e a incisão do pescoço para sangramento. Os métodos de atordoamento benevolente incluem atordoamento elétrico e atordoamento em atmosfera controlada, contanto que possa ser demonstrado que não afeta negativamente a qualidade ocular da galinha (ver parágrafo 21). Uma fonte local de frangos próxima ao laboratório deve ser localizada, de modo que suas cabeças possam ser transferidas do matadouro para o laboratório com rapidez suficiente para minimizar a

deterioração e/ou a contaminação bacteriana. O intervalo de tempo entre a coleta das cabeças de frango e a colocação dos olhos na câmara de superfusão, após a enucleação, deve ser minimizado (geralmente dentro de duas horas) para assegurar o cumprimento dos critérios de aceitação do ensaio. Todos os olhos usados no ensaio devem ser do mesmo grupo de olhos coletados em um dia específico.

20. Como os olhos são dissecados em laboratório, as cabeças intactas são transportadas da granja à temperatura ambiente (tipicamente entre 18°C e 25°C) em caixas plásticas úmidas, com tecidos umedecidos com solução salina isotônica.

Critérios de Seleção e Número de Olhos Usados no ICE

21. Os olhos que têm uma coloração base elevada, com fluoresceína (>0,5), ou uma com pontuação de opacidade da córnea (0,5), depois de serem enucleados, são rejeitados.

22. Cada grupo de tratamento e controle positivo concorrente consiste em, pelo menos, três olhos. O grupo de controle negativo ou o de controle de solvente (se utilizar um solvente diferente de solução salina) consiste em, no mínimo, um olho.

23. No caso de materiais sólidos levando a um resultado de Sem Categoria de GHS da ONU, recomenda-se uma segunda execução de três olhos, para se confirmar ou se descartar o resultado negativo.

PROCEDIMENTOS

Preparação dos Olhos

24. As pálpebras são cuidadosamente retiradas, evitando danificar a córnea. A integridade da córnea é rapidamente avaliada com uma gota de 2% (p/v) de fluoresceína de sódio, aplicada na superfície da córnea, por alguns segundos, e depois enxaguada com solução salina isotônica. Os olhos tratados com fluoresceína são examinados com um microscópio de lâmpada de fenda para assegurar que a córnea não está danificada (retenção de fluoresceína e pontuações de opacidade da córnea ≤0,5).

25. Se não estiver danificado, o olho é ainda destacado do crânio, tomando cui-

dado para não danificar a córnea. O globo ocular é retirado da órbita segurando firmemente a membrana nictitante com fórceps cirúrgico e os músculos oculares são cortados com uma tesoura de ponta romba curvada. É importante evitar causar danos na córnea devido à pressão excessiva (artefatos de compressão).

26. Quando o olho é removido da órbita, uma porção visível do nervo óptico deve ser deixada presa. Uma vez removido da órbita, o olho é colocado em uma almofada absorvente e a membrana nictitante e outro tecido conjuntivo são cortados.

27. O olho enucleado é montado em uma braçadeira (aço inoxidável ou alternativa adequada) com a córnea posicionada verticalmente, evitando muita pressão no olho pela braçadeira (devido à esclerótica relativamente firme do globo ocular da galinha, apenas uma ligeira pressão é necessária para posicionar o olho corretamente). O suporte é então transferido para uma câmara do aparelho de superfusão[25]. Os suportes devem ser posicionados no aparelho de superfusão, de modo que toda a córnea seja impregnada com o soro fisiológico isotônico (3-4 gotas por minuto ou 0,1 a 0,15mL/min). As câmaras do aparelho de superfusão devem ter temperatura controlada a 32 ± 1,5°C. O anexo 4 fornece um diagrama de um aparelho típico de superfusão e dos suportes para os olhos, que podem ser obtidos comercialmente ou construídos. O aparelho pode ser modificado para satisfazer as necessidades de um laboratório em específico (por exemplo, para acomodar um número diferente de olhos).

28. Depois de serem colocados no aparelho de superfusão, os olhos são novamente examinados com um microscópio de lâmpada de fenda (por exemplo, Haag-Streit BP900) para assegurar que não tenham sido danificados durante o procedimento de dissecção. A espessura da córnea também deve ser medida neste momento, no ápice da córnea, usando o dispositivo de medição de profundidade no microscópio de lâmpada de fenda. Olhos com: (i) uma pontuação de retenção de fluoresceína >0,5; (ii) opacidade da córnea >0,5; ou (iii), quaisquer sinais adicionais de dano devem ser substituídos. Para olhos que não são rejeitados com base em qualquer um desses critérios de rejeição, olhos com uma espessura da córnea que se desvia mais de 10% do valor médio, para todos os olhos, também devem ser rejeitados. Para a lâmpada de fenda Haag-Streit BP900 equipada com um dispositivo de medição da profundidade nº 1, a configuração da largura da fenda deve ser de 9½, igual a 0,095mm. Alternativamente, pode ser utilizada a lâmpada de fenda Haag-Streit BQ900, desde que possa ser montada

com o dispositivo de medição de profundidade e possa ser aplicada uma largura de fenda de 0,095 (ver também parágrafo 53). Os usuários devem estar cientes de que os microscópios com lâmpada de fenda podem produzir diferentes medições da espessura da córnea se a configuração da largura da fenda for diferente.

29. Uma vez que todos os olhos tenham sido examinados e aprovados, eles são incubados por aproximadamente 45 a 60 minutos para equilibrá-los ao sistema de teste antes da dosagem. Após o período de equilíbrio, é registrada uma medição de referência zero para a espessura e a opacidade da córnea – para servir como linha de base (tempo = 0). O escore de fluoresceína determinado na dissecção é usado como medida de linha de base para esse ponto de término.

Aplicação do teste químico

30. Imediatamente após as medições de referência zero, o olho (no seu suporte) é removido do aparelho de superfusão, colocado na posição horizontal e a substância química de teste é aplicada à córnea.

31. Substâncias químicas de teste líquidas são normalmente testadas não diluídas, mas também, podem ser diluídas – se considerado necessário (como parte do desenho do estudo). O solvente preferido para a diluição de substâncias químicas é soro fisiológico (isotônico). No entanto, solventes alternativos também podem ser usados, sob condições controladas, mas porém, a adequação de outros solventes, que não o soro fisiológico, deve ser demonstrada.

32. Aplicam-se substâncias químicas de teste à córnea, de tal modo que, toda superfície da mesma seja coberta uniformemente com a substância química em teste; o volume padrão é de 0,03mL.

33. Se possível, as substâncias químicas em teste sólidas devem ser moídas tão finamente quanto possível em um almofariz e pilão, ou em ferramenta de moagem comparável. O pó é aplicado à córnea de tal modo que a superfície seja uniformemente coberta com a substância química em teste; a quantidade padrão é de 0,03g.

34. A substância química em teste (líquida ou sólida) é aplicada durante 10 se-

gundos e depois enxaguada com solução salina isotônica (aproximadamente 20mL), à temperatura ambiente. O olho (no seu suporte) é posteriormente devolvido ao aparelho de superfusão na posição vertical original. Em caso de necessidade, pode ser utilizado enxágue adicional após a aplicação de 10 segundos e nos pontos subsequentes (após a descoberta de resíduos da substância química em teste na córnea). Em geral, a quantidade de solução salina adicionalmente usada para enxágue não é crítica, mas a observação da aderência da substância química à córnea é importante.

Substâncias químicas de controle

35. Controles negativos ou de solvente/ veículo simultâneos e controles positivos devem ser incluídos em cada experimento.

36. Ao testar líquidos a 100% ou sólidos, é utilizada solução salina fisiológica (isotônica) como controle negativo concorrente, no método de teste ICE, para detectar alterações não específicas no sistema de teste e para garantir que as condições do ensaio não resultem inadequadamente em uma resposta irritante.

37. Ao testar líquidos diluídos, um grupo de controle solvente/ veículo concorrente é incluído no método de teste para detectar mudanças não específicas no sistema de teste e para assegurar que as condições do ensaio não resultem inadequadamente em uma resposta irritante. Como afirmado no parágrafo 31, apenas um solvente/ veículo que tenha demonstrado não ter efeitos adversos no sistema de teste pode ser usado.

38. Um irritante ocular conhecido é incluído como um controle positivo concorrente em cada experiência, para verificar se uma resposta apropriada é induzida. Como o método de teste ICE está sendo usado, nesta Diretriz, para identificar substâncias químicas que causam danos oculares graves, o controle positivo deve ser uma substância química de referência que induza respostas que atendam aos requisitos de classificação, como Categoria 1 do GHS da ONU, neste método de teste. No entanto, para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta grave não deve ser excessiva. Devem ser gerados dados suficientes *in vitro* para o controle positivo, de modo a poder calcular-se um intervalo aceitável, estatis-

ticamente, definido para o controle positivo. Se dados históricos de método de teste ICE adequados não estiverem disponíveis para um controle positivo específico, talvez seja necessário realizar estudos para fornecer essas informações.

39. Exemplos de controles positivos, para substâncias químicas em teste líqui*das*, são 10% ácido acético ou 5% de cloreto de benzalcônio, enquanto exemplos de controles positivos, para substâncias químicas em testes sólidos, são hidróxido de sódio ou e imidazole.

40. As substâncias químicas de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de substâncias químicas desconhecidas, ou avaliar o potencial relativo de irritação de um irritante ocular dentro de uma gama de respostas irritantes.

Pontos de Término medidos

41. As córneas tratadas são avaliadas antes do tratamento e aos 30, 75, 120, 180 e 240 minutos (± 5 minutos) após o enxágue pós-tratamento. Esses pontos fornecem um número adequado de medições ao longo de um período de observação de quatro horas, deixando tempo suficiente entre as medições para as anotações requisitadas para todos os olhos.

42. Os pontos finais avaliados são opacidade da córnea, edema, retenção de fluoresceína e efeitos morfológicos – (depressão ao pressionar (pitting) ou afrouxamento do epitélio). Todos os pontos de término, com exceção da retenção de fluoresceína (que é determinada apenas antes do tratamento e 30 minutos após a exposição química do teste), são determinados em cada um dos pontos de tempo acima.

43. As fotografias são aconselháveis para documentar a opacidade da córnea, a retenção de fluoresceína, os efeitos morfológicos e a histopatologia, se realizada.

44. Após o exame ao final das quatro horas, os usuários são incentivados a preservar os olhos em um fixador apropriado (formalina tamponada neutra) para possível exame histopatológico, em particular para detergentes e surfactantes de pH não extremo (2<pH <11,5) (ver parágrafos 7, 14 e 56). Se histopatologia for realizada, os olhos devem ser fixados, aparados, embebidos em parafina, seccionados e corados, de acordo com os procedimentos descritos para a coleta e o processa-

mento de amostras histopatológicas no âmbito da Diretriz OECD 160[12].

45. O edema da córnea é determinado a partir de medições da sua espessura, feito com um paquímetro óptico em um microscópio de lâmpada de fenda. É expresso como uma percentagem, e é calculada a partir de medições da espessura da córnea, conforme a seguinte fórmula:

$$\left[\frac{\text{espessura da córnea no tempo t - espessura da córnea no tempo=0}}{\text{espessura da córnea no tempo = 0}} \right] *100$$

46. A percentagem média de edema da córnea para todos os olhos em teste é calculada para todos os pontos de observação. Com base na maior pontuação média para edema da córnea, observado em qualquer momento, é atribuída uma Classe ICE para cada substância química (ver parágrafo 53).

47. A opacidade da córnea é avaliada usando-se a área da córnea que é mais densamente opacificada para atribuir a pontuação, de acordo com as observações descritas na tabela 1. O valor médio da opacidade da córnea para todos os olhos de teste é calculado para todos pontos de observação. Com base na maior pontuação média para opacidade corneana, observada em qualquer momento, é atribuída uma classe ICE para cada substância química em teste (ver parágrafo 53).

Tabela 1. Escores de opacidade da córnea

Escore	Observação
0	Sem opacidade
0.5	Opacidade muito fraca
1	Áreas dispersas ou difusas; detalhes da íris são claramente visíveis
2	Área translúcida facilmente discernível; detalhes da íris são ligeiramente obscurecidos
3	Opacidade corneana severa; nenhum detalhe específico da íris é visível; tamanho da pupila é dificilmente discernível
4	Opacidade corneana completa; íris invisível

48. A retenção de fluoresceína é avaliada no ponto de observação de 30 minutos apenas, de acordo com as pontuações mostradas na tabela 2. O valor médio de retenção de fluoresceína de todos os olhos de teste é calculado para o ponto de

observação de 30 minutos e usado para atribuir um ICE para cada substância química em estudo (ver parágrafo 53).

Tabela 2. Pontuação de retenção de fluoresceína

Escore	Observação
0	
0.5	Coloração de célula única muito pequena
1	Coloração de célula única espalhada por toda a área da córnea
2	Coloração de célula única densa focal ou confluente
3	Grandes áreas confluentes da córnea retendo fluoresceína
4	Opacidade corneana completa; íris invisível

49. Os efeitos morfológicos incluem "pitting" de células epiteliais da córnea, "soltura" do epitélio, "rugosidade" da superfície da córnea e "colagem" da substância química em teste na córnea. Esses achados podem variar em gravidade e podem ocorrer simultaneamente. A classificação desses achados é subjetiva, de acordo com a interpretação do investigador.

50. Se a histopatologia for realizada, o sistema de pontuação semi-quantitativo descrito na tabela 3 deve ser usado. É fundamental distinguir, por exemplo, em relação aos efeitos de vacuolização epitelial, os efeitos relacionados com o tratamento de artefatos histopatológicos e/ou morfologia de fundo. Para este efeito, o atlas apresentado no Anexo II da Diretriz OECD 160 deve ser cuidadosamente consultado[12]. Além disso, slides (*) originais (em vez de fotomicrografias) precisam ser usados, pois alguns efeitos exigem uma avaliação tridimensional dos tecidos. Apenas os efeitos observados devem ser pontuados. Nenhuma suposição deve ser feita (por exemplo, se a camada superior do epitélio estiver faltando, não será possível pontuar para a vacuolação nessa camada). Todavia, os efeitos/ alterações próximos ao limbo devem ser pontuados se a arquitetura do tecido for preservada. No entanto, os efeitos/ alterações que ocorrem dentro do limbo não devem ser pontuados devido a efeitos não relacionados à exposição química. Um sistema de revisão por pares de patologia interna deve ser conduzido, de acordo com as recomendações atuais[23] e em conformidade com o documento consultivo nº 16 – sobre os requisitos de BPL para revisão por pares de histopatologia[24]. Nesse processo, um patologista (com experiência nos tecidos a serem

avaliados) revisa os pares com várias lâminas e dados de patologia (por exemplo, 1 de cada 3 olhos), para auxiliar o patologista do estudo a refinar diagnósticos e interpretações de patologias. Esse processo de revisão por pares permite verificar e melhorar a precisão e a qualidade dos diagnósticos e interpretações da patologia. Finalmente, treinamento consolidado, transferência e avaliação de proficiência são recomendados para assegurar observações histopatológicas consistentes.

(*) Diapositivos

Tabela 3. Sistema de escore histopatológico semi-quantitativo utilizado para olhos de galinha isolados que foram fixados, aparados, embebidos em cera de parafina, seccionados e corados

Parâmetro	**Observação**	**Escore**	**Descrição***
Epitélio: erosão	Muito leve	1/2	Poucas células individuais até toda a camada superficial única
	Leve	1	Até 3 camadas desapareceu
	Moderado	2	Até 50% da camada epitelial desapareceu*
	Severa	3	Camada epitelial desapareceu até a membrana basal
Epitélio: vacuolização Pontuado separadamente para as partes superior, média e inferior epitélio **	Muito leve	1/2	Uma única ou poucas células dispersas
	Leve	1	Grupos de células vacuoladas ou uma única cadeia de células com pequenos vácuos
	Moderado	2	Até 50% do epitélio consiste de células vacuoladas*
	Severa	3	50 - 100% do epitélio consiste de células vacuoladas
Epitélio: necrose ***	Normal	-	<10 células necróticas †
	Muito leve	1/2	10 a 20 células necróticas †
	Leve	1	20 a 40 células necróticas †
	Moderado	2	Muitas células necróticas mas <50% de camada epitelial
	Severa	3	50 a 100% da camada epitelial está necrosada

Parâmetro	Observação	Escore	Descrição*
Estroma: núcleos picnóticos ††††	Normal	-	<5 núcleos picnóticos
	Muito leve	1	5 a 10 núcleos picnóticos
	Leve	2	>10 núcleos picnóticos
	Moderado	P	Aparência irregular das fibras
	Severa	P	O endotélio consiste de uma camada só, portanto o grau não é relevante

Notas: O anexo II da Diretriz OECD 160[12] apresenta um Atlas com fotomicrografias típicas de olhos de frango isolados não tratados e tratados, ilustrando os vários possíveis efeitos histopatológicos descritos acima.

* Sobre toda a córnea, exceto no caso de substâncias químicas de teste (por exemplo, algumas substâncias químicas sólidas) que causam efeitos localizados, apesar da aplicação homogênea da substância química testada, conforme exigido pela Diretriz OECD 438. Nesse caso, a avaliação deve ser baseada nos efeitos localizados no(s) site(s) de exposição.

** As partes superior, média e inferior representam um terço das partes iguais da camada epitelial. Se a camada superior estiver faltando, a camada intermediária não se tornará a "nova" camada superior, mas ainda será a camada intermediária (ver Anexo II da Diretriz OECD 160 para obter mais detalhes[12]).

*** Apenas necrose de células/ tecidos anexados.

† Células necróticas são contadas em toda a extensão da córnea (não há necessidade de um comprimento fixo específico para relatar a contagem de células, porque todo o comprimento da córnea é consistente em cada lâmina, já que quase não há variação no tamanho da córnea dos olhos usados e no tamanho das amostras avaliadas microscopicamente). O sistema de pontuação usa contagens absolutas de células de "normal" a "leve", em comparação à porcentagem de "moderada" e "grave". Isso se deve à maneira como a avaliação é realizada pelo examinador: as células necróticas são vistas como itens isolados. Se houver mais, eles são geralmente espalhados. Portanto, o examinador conta-os para ter uma ideia da quantidade de necrose. Isso está em contraste com a erosão, para a qual o primeiro efeito que o examinador percebe é que uma parte do epitélio faltando, portanto, faz sentido usar uma porcentagem estimada de perda.

†† O método de teste ICE já inclui uma medição precisa da espessura da córnea usando-se um microscópio de lâmpada de fenda. Por isso, o edema do estroma não é pontuado separadamente durante a avaliação histopatológica subsequente.

††† Os efeitos estromais que são pontuados consistem em: (1) núcleos picnóticos, que se originam do sistema de pontuação usado por Maurer (2001), com base em suas observações em córneas de coelhos após exposição *in vivo* (descrita como perda de ceratócitos/ necrose) e de (2) desordem das fibras. Em relação a: (1) a presença de núcleos picnóticos, é observada apenas ocasionalmente e o desenvolvimento de núcleos picnóticos é proposto como dependente da profundidade da lesão e/ou do processo de inflamação

da córnea *(in vivo)*. Além disso, devido à forma alongada dos fibroblastos do estroma, os núcleos normais podem ser considerados, erroneamente, como núcleos picnóticos, dependendo da orientação da secção das células. Em relação: (2) a observação e à pontuação do distúrbio das fibras, estas podem ser difíceis, pois as fibras estromais já apresentam um distúrbio "natural". O processamento da córnea para microscopia também pode contribuir para um distúrbio artificial das fibras estromais. Em ambos os casos (núcleos picnóticos e desordem das fibras), essas constatações coincidem com os severos efeitos corneanos, já analisados pelas observações do microscópio com lâmpada de fenda, e com os efeitos apontados na camada epitelial média e/ou inferior.

52. A Diretriz OECD 438 exige que as substâncias químicas em teste sejam distribuídas homogeneamente na superfície ocular tratada. Com base em tal exposição, as substâncias químicas em teste geralmente causam efeitos homogêneos na córnea dos olhos de galinha isolados, por isso, e a média dos efeitos histopatológicos sobre toda a lâmina deve ser pontuada. No entanto, algumas substâncias químicas de teste podem causar efeitos focais ou multifocais, confinados a certos pontos, apesar de sua aplicação homogênea (como para algumas substâncias químicas de teste sólidas). Se forem observados efeitos (multi) focais durante a realização do método de teste ICE, o histopatologista deve ser informada, e a pontuação histopatológica deve ser conduzida com base nos efeitos adversos localizados e observados onde ocorreu a exposição à substância química em estudo. Além disso, se permanecerem dúvidas (uma discrepância entre os resultados da ICE e as análises histopatológicas), lâminas adicionais podem ser preparadas em outras partes da córnea, para assegurar que os efeitos localizados estejam presentes na seção observada.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação de dados

53. Os resultados de opacidade da córnea, edema e retenção de fluoresceína devem ser avaliados separadamente, para gerar uma classe ICE para cada end point. As classes ICE para cada término da avaliação são combinadas para prever a classificação *in vitro* de cada substância química em teste. Da mesma forma, a avaliação histopatológica, se aplicável, deve ser conduzida separadamente, e considerada de acordo com os parágrafos 55 e 56.

Critério de decisão

54. Uma vez que cada término do teste tenha sido avaliado, as classes ICE po-

dem ser atribuídas com base em um intervalo predeterminado. A interpretação do edema da córnea (tabela 4), da opacidade (tabela 5) e da retenção de fluoresceína (tabela 6), usando quatro classes de ICE, feita de acordo com as escalas mostradas abaixo. É importante ressaltar que as pontuações de expansão da córnea, mostradas na tabela 4, só são aplicáveis se a espessura for medida com um microscópio de lâmpada de fenda Haag-Streit BP900 (ou, alternativamente, um microscópio de lâmpada de fenda Haag-Streit BQ900) com dispositivo de medição de profundidade nº 1 e configuração de largura de fenda em 9½, igual a 0,095mm. Os usuários devem estar cientes de que os microscópios com lâmpada de fenda podem produzir diferentes medições da espessura da córnea, se a configuração da largura da fenda for diferente.

Tabela 4. Critérios de classificação do ICE para edema da córnea

Inchaço da córnea média (%) *	**Classe ICE**
0 a 5	I
>5 a 12	II
>12 a 18 (> 75 min após o tratamento)	II
>12 a 18 (= 75 min após o tratamento)	III
>18 a 26	III
>26 a 32 (>75 min após o tratamento)	III
>26 a 32 (=75 min após o tratamento)	IV
>32	IV

Nota: Maior pontuação média observada em qualquer momento.

Tabela 5. Critérios de classificação do ICE para opacidade

Escore de Opacidade Média Máxima*	**Classe ICE**
0.0 - 0.5	I
0.6 - 1.5	II
1.6 - 2.5	III
2.6 - 4.0	IV

Nota: Pontuação média máxima observada em qualquer momento (com base nos escores de opacidade definidos na tabela 1).* Com base nas pontuações definidas na tabela 2.*

Tabela 6. Critérios de classificação do ICE para retenção média de fluoresceína

Escore Médio de Retenção de Fluoresceína aos 30 minutos pós-tratamento*	**Classe ICE**
0.0 - 0.5	I
0.6 - 1.5	II
1.6 - 2.5	III
2.6 - 4.0	IV

Nota: Com base nas pontuações definidas na tabela 2.

55. A classificação *in vitro* de uma substância química em teste é avaliada pela leitura da classificação UN GHS, que corresponde à combinação de categorias obtidas para edema, e opacidade da córnea e, retenção de fluoresceína, conforme descrito na tabela 7.

Tabela 7. Classificações globais in vitro

Classificação da GHS da ONU	**Combinação de 3 end points**
Sem Categoria	3 x 1
	2 x 1, 1 x II
	2 x II, 1 x I
Nenhuma previsão pode ser feita	Outras Combinações
Categoria 1	3 x IV
	2 x IV, 1 x III
	2 x IV, 1 x II*
	2 x IV, 1 x 1*
	Opacidade corneana = 3 aos 30 minutos (em, ao menos, 2 olhos)
	Opacidade corneana = 4 em qualquer momento (em, ao menos, 2 olhos)
	Severo deslocamento do epitélio (em pelo menos 1 olho)

Nota: As combinações são menos prováveis de ocorrer.

56. Se a histopatologia for usada para detergentes e surfactantes de pH não-extremo ($2<pH<11,5$), os critérios de decisão mostrados na tabela 8 devem ser usados. Entretanto, no caso de pontuações de núcleos picnóticos estromais ≥

leves (escore 1) em, pelo menos, 2 de 3 olhos ou quaisquer efeitos endoteliais forem observados em, pelo menos, 2 dos 3 olhos, tais efeitos devem ser anotados como indicadores de severidade dos efeitos.

Tabela 8. Critérios de decisão de histopatologia a serem usados em adição ao método de teste padrão ICE validado, para a identificação de detergentes e surfactantes de pH não-extremo (2<pH <11,5) da categoria 1 do GHS da ONU.

Camada de Tecido	**Efeitos identificados que desencadeiam danos severos aos olhos (Categoria 1 GHS UN)**
Epitélio	Erosão = moderada (escore 2) em, pelo menos, 2 dos 3 olhos
	e/ou qualquer vacuolização (= muito leve, escore 1/2) observado nas partes intermediárias e inferiores em, pelo menos, 2 dos 3 olhos
	ou, se erosão = moderada (escore 2) em 1 dos 3 olhos + vacuolização = muito leve nas partes intermediárias e inferiores (escore 1/2) observada em, pelo menos outro olho, além dos 3
	e/ou necrose = moderada (escore 2) observada em, pelo menos 2 dos 3 olhos

57. Portanto, o modelo de previsão mostrado na tabela 9 deve ser usado. Os critérios de histopatologia da ICE e o modelo de previsão, descrito nas tabelas 8 e 9, respectivamente, são aplicáveis apenas para identificar detergentes e surfactantes de pH não-extremo (2<pH <11,5) da categoria 1 do GHS da ONU.

Tabela 9. Modelo de predição para identificação de detergentes e surfactantes de pH não extremo (2<pH <11,5) com base nas avaliações histopatológicas da ICE

Padrão ICE	**Critérios de histopatologia ICE descrito na tab. 8**	**Classificação da UN GHS**
Nenhuma previsão pode ser feita	Critérios atingidos	Categoria 1 UN GHS
	Critérios não atingidos	Nenhuma previsão pode ser feita

Critérios de Aceitação do Estudo

58. Um ensaio é considerado aceitável se o controle negativo concorrente ou o controle veículo/ solvente e os controles positivos concorrentes forem identificados como Categoria 1 e Não-Classificado no UN GHS, respectivamente.

Relatório de teste

59. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações, se relevantes para a condução do estudo:

Substâncias químicas em teste e de controle

- Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) de registro CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores;
- Pureza e composição da substância ou mistura de ensaio/ controle (em percentagem(ns) por peso), se disponível;
- No caso de multiconstituintes e UVCB: caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, identidade química (ver acima), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver acima) dos constituintes, na medida em que estejam disponíveis;
- Propriedades físico-químicas, tais como estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, solubilidade em água de classe química relevantes para a realização do estudo;
- Tratamento do teste químico de controle antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem);
- Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do disponível.

Informações sobre o patrocinador e a instalação de teste

- Nome e endereço do patrocinador, da instalação de teste e do diretor de estudo; quando aplicável, do patologista do estudo;
- Identificação da fonte dos olhos (por exemplo, a instalação da qual foram coletados).

Condições do Método de Teste

- Descrição do sistema de teste utilizado;
- Microscópio de lâmpada de fenda e paquímetro usado (por exemplo, modelo) e as configurações de instrumento usadas;
- Referência aos resultados históricos negativos e positivos do controle e, se aplicáveis, dados históricos demonstrando faixas de controle de referência concorrentes aceitáveis;

- O procedimento usado para garantir a integridade (ou seja, precisão e confiabilidade) do método de teste ao longo do tempo (por exemplo, testes periódicos de substâncias químicas de proficiência);
- O procedimento utilizado para a fixação dos tecidos na histopatologia, se realizado.

Coleta e Preparação de Olhos

- Idade e peso do animal doador e, se disponíveis, outras características específicas dos animais a partir dos quais os olhos foram recolhidos (por exemplo, sexo, raça);
- Condições de armazenamento e transporte dos olhos (por exemplo, data e hora da coleta do olho, intervalo de tempo entre a coleta das cabeças de galinha e a colocação dos olhos enucleados na câmara de superfusão);
- Preparação e montagem dos olhos, incluindo declarações sobre a qualidade, a temperatura das câmaras oculares e os critérios de seleção dos olhos usados para o teste.

Procedimento de teste

- Número de repetições usadas;
- Identidade dos controles negativos e positivos utilizados (se aplicável, também dos controles de solvente e de referência);
- Dosagem da substância química em teste, aplicação e tempo de exposição utilizado;
- Pontos de tempo de observação (pré e pós-tratamento);
- Descrição dos critérios de avaliação e decisão utilizados, incluindo para histopatologia, se aplicável;
- Sistema de revisão por pares utilizados para observações histopatológicas, se aplicável;
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;
- Descrição de quaisquer modificações do procedimento de teste;

• Além disso, se não estiver incluído no Procedimento Operacional Padrão (SOP), quando disponíveis, as seguintes informações devem ser acrescentadas:

- Descrição da formação consolidada e transferibilidade;
- Agentes fixadores, desidratantes e clarificadores e protocolos utilizados;
- Material de incorporação, solventes de infiltração e concentrações utilizadas;
- Espessura das secções de tecido;
- Coloração (no relatório) e o protocolo de coloração associado usado;
- Informações sobre instrumentos utilizados.

Resultados

- Tabulação dos escores de retenção de opacidade, fluorescência e opacidade da córnea, obtidos para cada olho individualmente e em cada momento da observação, incluindo as pontuações médias de cada análise em todos os olhos testados;
- Descrição de quaisquer efeitos morfológicos observados;
- Os maiores valores médios apontados na retenção de edema, opacidade e fluoresceína na córnea (a partir de qualquer momento) e sua relação com a classe ICE;
- Tabulação de observações de pontuação semi-quantitativa histopatológicas e conclusões derivadas, se aplicável;
- Se aplicável, indicação de uso de efeitos localizados para pontuação histopatológica;
- Descrição de quaisquer outros efeitos observados;
- A classificação derivada do GHS *in vitro;*
- Se apropriado, fotografias dos olhos tratados e controle;
- Se aplicável, imagens digitais opcionais ou digitalizações de slides digitais das amostras de histopatologia.

Discussão dos resultados

Conclusão

LITERATURA

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication Nº 07-4517. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication Nº: 10-7553A. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm]

(4) United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Seventh revised edition, UN New York and Geneva, 2017. Available at: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/03e_part3.pdf.

(5) OECD (2018). Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment Nº 188. ENV Publications, OECD, Paris.

(6) OECD (2018). Test Guideline 492. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.

(7) OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Test-

ing and Assessment, Nº 263.Environment, Health and Safety Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(8) Adriaens E., Barroso J., Eskes C., Hoffmann S., McNamee P., Alépée N., Bessou-Touya S., De Smedt A, de Wever B., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Zuang V. (2014). Draize test for serious eye damage / eye irritation: importance of the endpoints evaluated with regard to UN GHS / EU CLP classification. Archives of Toxicology 88, 701-723.

(9) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2014). Suitability of histopathology as an additional end point to the isolated chicken eye test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. Toxicology In Vitro 28, 657-666.

(10) Reproducibility and predictive capacity of the Isolated Chicken Eye Test for the identification of non-extreme pH detergents and surfactants causing serious eye damage. Manuscript in preparation.

(11) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. Toxicology In Vitro 24, 1-9.

(12) OECD (2018) Guidance Document on "The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment Nº 160. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(13) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits.Fd. Chem. Toxicol. 31, 69-76.

(14) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Available at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(15) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicol. In Vitro 9, 871-929.

(16) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. Food Chem. Toxicol. 34, 291-296.

(17) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. Food Chem. Toxicol. 35, 23-37.

(18) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication Nº: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(19) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2015). Suitability of the Isolated Chicken Eye Test for Classification of Extreme pH Detergents and Cleaning Products. Toxicology In Vitro 29, 609-616.

(20) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? Toxicology in Vitro 20,78-81.

(21) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available at: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(22) Barroso J., Pfannenbecker U., Adriaens E., Alépée N., Cluzel M., De Smedt A., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Templier M., McNamee P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). Archives of Toxicology 91, 521-547.

(23) Morton D., Sellers R.S., Barale-Thomas E., Bolon B., George C., Hardisty J.F., Irizarry A., McKay J.S., Odin M., Teranishi M. (2010). Recommendations for Pathology Peer Review. Toxicol. Pathol. 38, 1118-1127.

(24) OECD (2014). Advisory document nº 16. Guidance on the good laboratory practice (GLP) Requirements for Peer Review of Histopathology. OECD Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Advisory document of the working group on GLP. ENV/JM/MONO(2014)30. Organisa-

tion for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm.

(25) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The in vitro assessment of severe irritants. Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 471-480.

(26) OECD (2017). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.

ANEXO 1
Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida de desempenho do método e um aspecto de "relevância". O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância", para significar a proporção de resultados corretos de um método.

Substância química de referência: uma substância química utilizada como padrão para comparação com uma substância química em teste. Uma substância química de referência deve ter as seguintes propriedades: (i) uma fonte consistente e confiável; (ii) similaridade estrutural e funcional à classe de substâncias químicas testadas; (iii) características físico-químicas conhecidas; (iv) dados de apoio sobre efeitos conhecidos; e (v), potência conhecida no intervalo da resposta desejada.

Abordagem Bottom-Up: abordagem passo a passo usada para uma substância química suspeita de não requerer classificação para irritação ocular ou dano ocular grave, que começa com a determinação de substâncias químicas que não exigem classificação (resultado negativo) de outras substâncias químicas (resultado positivo).

Córnea: a parte transparente da frente do globo ocular que cobre a íris e a pupila e admite a luz para o interior.

Opacidade da córnea: medição da extensão da opacidade da córnea após a exposição a uma substância química em teste. O aumento da opacidade da córnea é indicativo de danos na córnea.

Edema da córnea: uma medida objetiva no teste ICE de extensão da distensão da córnea após a exposição a uma substância química em teste. É expresso expressa em percentagem, sendo e é calculado calculada a partir das medições da espessura da córnea, da linha de base (pré-dose) e da espessura registrada em intervalos regulares, após a exposição ao material avaliado no teste ICE. O grau de edema da córnea é indicativo de danos na córnea.

Detergentes: uma mistura (excluindo diluições de surfactante único) contendo um ou mais tensioativos numa na concentração final >3%, destinada a processos de lavagem e limpeza. Os detergentes podem estar em qualquer forma (líquido, pó, pasta, barra, bolo, peça moldada, forma, etc.) e comercializados ou usados em lar, ou fins institucionais ou industriais.

Irritação ocular: produção de alterações oculares após a aplicação do teste químico na superfície anterior do olho, que são totalmente reversíveis dentro de 21 dias após a aplicação. Intercambiável com "efeitos oculares reversíveis " e com "Categoria 2 do GHS da ONU"[4].

Taxa negativa falsa: a proporção de todas as substâncias químicas positivas falsamente identificadas por um método de teste como negativas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Taxa falsa positiva: a proporção de todas as substâncias químicas negativas que são falsamente identificadas por um método de teste como positivas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Retenção de fluoresceína: uma medida subjetiva no teste ICE da extensão de fluoresceína sódica que é retida pelas células epiteliais na córnea após a exposição a uma substância química em teste. O grau de retenção de fluoresceína é indicativo de danos no epitélio da córnea.

Risco: propriedade inerente de um agente ou situação que tem o potencial de causar efeitos adversos quando um organismo, um sistema ou uma (sub)população é exposto a esse agente.

AITA: Abordagem Integrada em Teste e Avaliação.

Efeitos irreversíveis oculares: ver "Lesões oculares graves" e "Categoria 1 do GHS da ONU".

Mistura: uma mistura ou uma solução composta de duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem[4].

Controle negativo: uma réplica não tratada contendo todos os componentes de um sistema de teste. Esta amostra é processada com amostras tratadas com substâncias químicas em teste e outras amostras de controle para determinar se o solvente interage com o sistema de teste.

Não classificado: teste as substâncias químicas que não são classificadas para irritação ocular (Categoria 2 do GHS da ONU) ou danos sérios aos olhos (Categoria 1 do GHS da ONU). Intercambiável com "Sem Categoria UN GHS".

Controle positivo: um replicado contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância química conhecida por induzir uma resposta positiva. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta grave não deve ser excessiva.

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado reprodutivelmente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, quando realizado usando-se o mesmo protocolo. Avalia-se calculando a reprodutibilidade intra e interlaboratorial e a reprodutibilidade intralaboratorial.

Efeitos reversíveis oculares no olho: ver "Irritação ocular " e "Categoria 2 GHS da ONU".

Lesões oculares graves: produção de danos nos tecidos oculares ou grave declínio físico da visão, após a aplicação de uma substância química em teste na superfície ocular anterior, que não é totalmente reversível dentro de 21 dias da aplicação. Intercambiável com "Efeitos irreversíveis oculares" e com "Categoria 1 do GHS da ONU"[4].

Microscópio de lâmpada de fenda: um instrumento usado para examinar diretamente o olho sob a ampliação de um microscópio binocular, criando uma imagem ereta estereoscópica. No método de teste ICE, este instrumento é usado para visualizar as estruturas oculares do frango, bem como, para medir objetivamente a espessura da córnea com um acessório de medição de profundidade.

Controle de solvente/ veículo: uma amostra não tratada contendo todos os componentes de um sistema de teste, incluindo o solvente ou o veículo que é processado com as amostras tratadas e, com outras amostras de controle, para estabelecer a resposta base para as amostras tratadas com a substância química testada (mesmo solvente ou veículo). Quando testado com um controle negativo concorrente, essa amostra também demonstra se o solvente ou o veículo interage com o sistema de teste.

Substância: elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção. Incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo usado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou sem alterando alterar a sua composição[4].

Surfactantes: também chamado de agente tensoativo, é uma substância e/ou sua diluição (em um solvente/ veículo apropriado), que consiste em um ou mais grupos hidrofílicos e, em um ou mais grupos hidrofóbicos. É capaz de reduzir a tensão superficial de um líquido e de formação de monocamadas de dispersão ou adsorção na interface água-ar e/ou de formação de emulsões e/ou microemulsões e/ou micelas e/ou de adsorção em interfaces água-sólido.

Abordagem de cima para baixo: abordagem passo a passo usada para uma substância química suspeita de causar dano ocular grave, que começa com a determinação de substâncias químicas que induzem danos oculares graves (resultado positivo) de outras substâncias químicas (resultado negativo).

Substância química de ensaio: substância química (substância ou mistura) avaliada no método de ensaio.

Estratégia de teste escalonada: todas as informações existentes sobre uma substância química em teste são revisadas, em uma ordem especificada, usando um

processo de peso de evidência em cada camada para determinar se há informações suficientes disponíveis para uma decisão de classificação de perigo, ou de progressão para o próximo nível. Se o potencial de irritação de uma substância química em teste puder ser atribuído com base nas informações existentes, nenhum teste adicional é necessário. Se o potencial de irritação de uma substância química em teste não puder ser atribuído com base nas informações existentes, um procedimento de teste sequencial em animais será realizado, por etapas, até que uma a classificação inequívoca possa ser feita.

Sistema Globalmente Harmonizado das Nações Unidas de Classificação e Rotulagem de Substâncias químicas (GHS da ONU): um sistema que propõe a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas), de acordo com tipos e níveis padronizados de riscos físicos, de saúde e ambientais, e abordando elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, declarações de perigo, declarações de precaução e fichas de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos, com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o ambiente[4].

Categoria 1 do GHS da ONU: veja ver "Danos graves oculares.

Categoria 2 do GHS da ONU: ver "Irritação " e/ou "Efeitos reversíveis oculares no olho".

Nenhuma Categoria do ONU: testar substâncias químicas que não atendem aos requisitos para classificação como UN GHS Categoria 1 ou 2 (2A ou 2B). Intercambiável com "Não classificado".

Método de teste validado: um método de teste no qual estudos de validação foram concluídos para determinar a relevância (incluindo precisão) e a confiabilidade de um propósito específico. É importante observar que um método de teste validado pode não ter desempenho suficiente em termos de precisão e confiabilidade para ser considerado aceitável ao propósito proposto.

Método baseado em evidência: o processo de considerar os pontos fortes e fracos de várias informações para alcançar e apoiar uma conclusão sobre o potencial de risco de uma substância química.

ANEXO 2

Substâncias químicas de proficiência para o método de ensaio de gelo

Antes do uso rotineiro de um método de teste que atenda a esta Diretriz, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, identificando corretamente a classificação de risco ocular das 13 substâncias químicas recomendadas na tabela 10. Os resultados do ICE fornecidos representam exemplos da faixa de respostas observadas durante o teste. Estudos de avaliação e que podem ser esperados[5;18]. Essas substâncias químicas foram selecionadas para representar a faixa de respostas para os perigos oculares com base nos resultados do teste ocular de coelho *in vivo* (Diretriz 405) e do sistema de classificação GHS da ONU (Categorias 1, 2A, 2B ou Nenhuma Categoria do GHS da ONU[4;26]). Outros critérios de seleção foram, na medida do possível, que essas substâncias químicas produzissem resultados reprodutíveis no método de teste ICE, que estão estivessem comercialmente disponíveis e que têm tivessem dados de referência *in vivo* de alta qualidade. Dados de referência também estão disponíveis no SSD(5). Em situações nas quais uma substância química listada não esteja disponível ou não possa ser utilizada, por outras razões justificadas, outra substância química que cumpra os critérios descritos acima, como as substâncias químicas utilizadas na avaliação e validação do método de teste ICE, poderia poderá ser usada[5;18]). Tais desvios devem, no entanto, ser justificados.

Tabela 10. Substâncias químicas recomendadas para demonstrar proficiência técnica com o ICE

Produto químico	CASRN	Classe Química[1]	Forma Física	Classificação UN GHS *in vivo*[2]	Classificação ICDE da GHS da ONU[3.4]
Cloreto de benzalcônio (10%)	8001-54-5	Composto Onio	Líquido	Categoria 1	Categoria 1
Clorexidina	55-56-1	Amina, Amidina	Sólido	Categoria 1	Categoria 1
Hidróxido de Sódio (10%)	1310-73-2	Álcali	Líquido	Categoria 1	Categoria 1
Imidazole	288-32-4	Heterocíclico	Sólido	Categoria 1	Categoria 1
Ácido tricloloacético (30%)	76-03-9	Ácido carboxilico	Líquido	Categoria 1	Categoria 1

Produto químico	CASRN	Classe Química[1]	Forma Física	Classificação UN GHS *in vivo*[2]	Classificação ICDE da GHS da ONU[3,4]
Cloreto 2,6-di-clorobenzoílo	4659-45-4	Halogeneto de acilo	Líquido	Categoria 2A	Nenhuma previsão pode ser feita
Nitrato de amônia	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólido	Categoria 2A[5]	Nenhuma previsão pode ser feita
Hidróxido de Sódio (10%)	1310-73-2	Álcali	Líquido	Categoria 2B	Nenhuma previsão pode ser feita
Sulfóxido de dimetilo	67-67-5	Composto orgânico de enxofre	Líquido	Sem Categoria	Sem Categoria
Acetato de etil trimetil	3938-95-2	Ester	Líquido	Sem Categoria	Sem Categoria
Metilciclopen-tano	96=37-7	Hidrocarboneto (cíclico)	Líquido	Sem Categoria	Sem Categoria
n-hexano	110-54-3	Hidrocarbonetoo (cíclico)	Líquido	Sem Categoria	Sem Categoria
Triacetina	102-76-1	Lipídio	Líquido	Sem Categoria	Sem Categoria

Abreviaturas: CASRN = Número de registro do Chemical Abstracts Service; ICE: teste ocular de galinha isolado; n.a.: não disponível; UN GHS = Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas das Nações Unidas(4).

[1] Classes químicas foram atribuídas a cada substância usando-se um esquema de classificação padrão, baseado no sistema de classificação Medical Subject Headings (MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina (disponível em http://www.nlm.nih.gov/ mesh).

[2] Com base nos resultados do teste ocular de coelho *in vivo* (Diretriz OECD 405) e utilizando o GHS da ONU(4;26).

[3] Com base nos resultados do ICE, conforme descrito na tabela 7.

[4] Combinação de escores ICE diferentes dos descritos na tabela 6 para a identificação de nenhuma Categoria de GHS e categoria 1 de GHS (ver tabela 7).

[5] A classificação como 2A ou 2B depende da interpretação do critério do GHS da ONU para distinguir entre essas duas categorias, ou seja, 1 de 3 *versus* 2 de 3 animais com efeitos no dia 7, necessários para gerar uma classificação de Categoria 2A. O estudo *in vivo* incluiu 3 animais. Todos os extremos, para além da vermelhidão conjuntiva num animal, recuperaram para uma pontuação de zero no dia 7 ou anterior. O único animal que não recuperou totalmente no dia 7 teve uma pontuação de vermelhidão conjuntiva de 1 (no dia 7) que se recuperou totalmente no dia 10.

ANEXO 3

Substâncias químicas de proficiência para a histopatologia em gelo, para ser usada em adicão ao método de ensaio em gelo padrão para o domínio de aplicabilidade limitada dos detergentes e surfactantes de ph não-extremos (2<ph <11,5)

Antes do uso rotineiro da histopatologia da ICE, além do método de teste padrão ICE para o domínio de uso limitado de detergentes e surfactantes de pH não-extremo (2<pH <11,5), os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica identificando corretamente a classificação de risco ocular de 6 substâncias químicas recomendadas na tabela 11. Estas substâncias químicas foram selecionadas para representar a faixa de respostas para os perigos oculares com base nos resultados do teste ocular de coelho *in vivo* (Diretriz 405) e do sistema de classificação UN GHS (Categorias 1, 2, ou Nenhuma Categoria)[4;26]. Outros critérios de seleção foram, na medida do possível, que estas substâncias químicas deveriam produzir resultados reprodutíveis na histopatologia da ICE, que estivessem comercialmente disponíveis e tivessem dados de referência *in vivo* de alta qualidade. Em situações em que uma substância química listada não esteja disponível ou não possa ser utilizada, por outras razões justificáveis, outra substância química que cumpra os critérios descritos acima, como substâncias químicas utilizadas na avaliação da histopatologia da ICE, podem ser utilizadas[10]. Tais mudanças devem, no entanto, ser justificadas.

Tabela 11. Substâncias químicas recomendadas para demonstrar proficiência técnica com histopatologia da ICE

Produto químico	CASRN	Tipo de surfactante	Estado físico	Classificação *in vivo*[1]	Classificação ICE padrão da UN GHS[2]
Cloreto de benzalcônio (10%)	8001-54-5	Catioônico	Líquido	Categoria 1	Categoria 1
Cloreto de benzenisulfonilo	98-09-9	Aniônico	Líquido	Categoria 1	Categoria 1
Brometo de catilpiridinio(10%)	140-72-7	Catioônico	Líquido	Categoria 1	Nenhuma previsão pode ser feita
Brometo de cetilpiridinio(1%)	140-72-7	Heterocíclico	Sólido	Categoria 2A	Nenhuma previsão pode ser feita
Lauril sarcosinato sodico	137-16-6	Aniônico	Líquido	Categoria 2 A	Nenhuma previsão pode ser feita
Brometo de cetilpiridinio (0,1%)	140-72-7	Catioônico	Líquido	Sem categoria	Nenhuma previsão pode ser feita

Abreviaturas: CASRN = Número de registro do Chemical Abstracts Service; NPCM: nenhuma previsão pode ser feita.

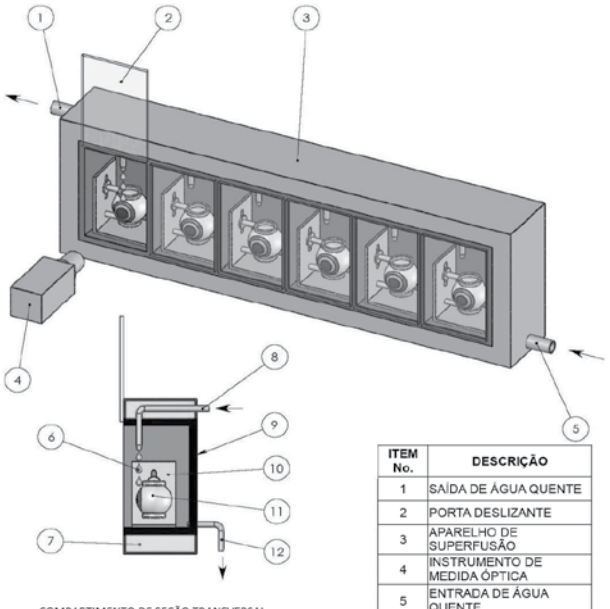
[1] Com base nos resultados do teste ocular de coelho *in vivo* (Diretriz OECD 405) e utilizando o GHS da ONU[4,26].

[2] Com base nos resultados da ICE, conforme descrito na tabela 7.

[3] Com base nos critérios de histopatologia da ICE, conforme descrito nas tabelas 8 e 9 e na revista OECD Diretriz 160[12].

ANEXO 4

Figura 1. Diagramas do aparelho de superfusão de gelo e pinças oculares



ITEM No.	DESCRIÇÃO
1	SAÍDA DE ÁGUA QUENTE
2	PORTA DESLIZANTE
3	APARELHO DE SUPERFUSÃO
4	INSTRUMENTO DE MEDIDA ÓPTICA
5	ENTRADA DE ÁGUA QUENTE
6	SOLUÇÃO SALINA
7	ÁGUA QUENTE
8	ENTRADA DE SOLUÇÃO SALINA
9	COMPARTIMENTO
10	SUPORTE DO OLHO
11	OLHO DA GALINHA
12	SAÍDA DA SOLUÇÃO SALINA
13	PARAFUSO
14	BRAÇO DE AJUSTE SUPERIOR
15	BRAÇO INFERIOR FIXO

Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 460

Método de teste de vazamento de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e irritantes severos

INTRODUÇÃO

1. O método de teste de Vazamento de Fluoresceína (FL) é um método de teste *in vitro* que pode ser usado, sob certas circunstâncias e com limitações específicas, para classificar substâncias químicas (substâncias e misturas), tais como corrosivos oculares e irritantes graves, conforme definido pelo Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS) (Categoria 1) da Organização das Nações Unidas (ONU), pelo Regulamento da União Europeia (UE) sobre Classificação, Rotulagem e Embalagem de Substâncias e Misturas (CLP) (Categoria 1) e pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) (Categoria I)[1-3]. Para efeito desta Diretriz de Teste, definem-se, como irritantes severos, as substâncias químicas que causam dano irreversível no prazo de 21 dias ou séria deterioração da visão após sua administração, enquanto corrosivos oculares são substâncias químicas que causam danos irreversíveis ao tecido do olho. Essas substâncias químicas são classificadas como Categoria 1 do GHS da ONU, Categoria 1 do CLP da UE e Categoria I da EPA.

2. Embora o método de teste FL não seja considerado válido como um substituto completo para o teste do olho de coelho *in vivo*, o FL é recomendado para uso como parte de uma estratégia de teste escalonada para classificação e rotulagem regulamentar. Assim, o FL é recomendado como um passo inicial, dentro de uma abordagem descendente ("Top-Down"), para identificar corrosivos oculares/irritantes severos, especificamente para tipos limitados de substâncias químicas (isto é, substâncias e misturas solúveis em água)[4,5]. A escolha do método de teste mais apropriado e a utilização desta Diretriz de Teste devem ser vistas no contexto do Documento de Orientação da OECD sobre Abordagens Integradas de Teste e Avaliação para Danos Oculares e Irritação Ocular Grave[10].

3. Na atualidade, é aceito que, num futuro previsível, nenhum teste *in vitro* de irritação ocular será capaz de substituir o teste ocular *in vivo* (Diretriz 405[6], do inglês "Test Guideline") para prever toda a gama de irritação para diferentes classes químicas. No entanto, combinações estratégicas de vários métodos de teste

alternativos, dentro de uma estratégia de teste (escalonada), podem substituir o teste ocular *in vivo*[5]. A abordagem descendente[5] é projetada para ser usada quando, com base nas informações existentes, uma substância química tem alto potencial de irritação.

4. Com base no modelo de previsão detalhado no parágrafo 35, o método de teste FL pode identificar substâncias como corrosivos oculares/irritantes graves (Categoria 1 do GHS; Categoria 1 do CLP; Categoria da EPA) dentro de um domínio de aplicabilidade limitado, sem nenhum outro teste. O mesmo é assumido para misturas, embora estas não tenham sido usadas na validação. Portanto, o método de teste FL pode ser usado para determinar a irritação/corrosão ocular de produtos químicos, seguindo a estratégia de teste sequencial da Diretriz 405[6]. Todavia, um produto químico que não é previsto como corrosivo ocular ou irritante grave, com o método de teste FL, precisaria ser testado em um ou mais métodos de teste adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*) capazes de identificar com precisão: i) substâncias químicas que tiveram resultado de corrosão ocular/irritação severa *in vitro* falso negativo no FL (Categoria 1 do GHS; Categoria 1 do CLP; Categoria da EPA); ii) substâncias químicas que não estão classificadas como corrosivo/irritante ocular (Sem categoria do GHS; Sem categoria do CLP; Categoria IV EPA); e/ou iii) substâncias químicas que são moderadamente irritantes para os olhos (Categoria 2A e 2B do GHS; Categoria 2 do CLP; Categoria II e III EPA).

5. O objetivo desta Diretriz de Teste é descrever os procedimentos usados para avaliar a potencial corrosividade ocular ou de irritação grave de uma substância de teste, medindo sua capacidade de induzir dano a uma monocamada epitelial confluente impermeável. A integridade da permeabilidade transepitelial é uma função importante de um epitélio como o encontrado na conjuntiva e na córnea. A permeabilidade transepitelial é controlada por várias junções estreitas. O aumento da permeabilidade do epitélio da córnea *in vivo* demonstrou correlacionar-se com o nível de inflamação e danos na superfície observados à medida que a irritação ocular se desenvolve.

6. No método de ensaio FL, os efeitos tóxicos após curto período de exposição à substância de teste são medidos pelo aumento da permeabilidade da fluoresceína sódica através da monocamada epitelial de células de rim canino Madin-Darby (MDCK) cultivadas em inserções permeáveis. A quantidade de vazamento de fluoresceína que ocorre é proporcional aos danos induzidos por substâncias

químicas nas junções estreitas, nas junções desmossômicas e nas membranas celulares, podendo ser usada para estimar o potencial de toxicidade ocular de uma substância de teste. O anexo I fornece um diagrama de células MDCK crescidas em uma membrana de inserção para o método de teste FL.

7. Definições são fornecidas no anexo II.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

8. Esta Diretriz está baseada no protocolo INVITTOX N° 71[7] que foi avaliado em um estudo de validação internacional pelo Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM)[8], em colaboração com o Comitê de Coordenação Interinstitucional dos EUA sobre a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM) e o Centro Japonês para Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM).

9. O método de teste FL não é recomendado para a identificação de substâncias químicas que devam ser classificadas como irritantes leves/moderadas ou de substâncias químicas que não devem ser classificadas para irritação ocular (substâncias e misturas) (por exemplo, GHS Categoria 2A/2B, nenhuma categoria; CLP Categoria 2, nenhuma categoria; EPA Categoria II/III/IV), conforme demonstrado pelo estudo de validação[4;8].

10. O método de ensaio só é aplicável a substâncias químicas solúveis em água (substâncias e misturas). O potencial de irritação ocular grave de substâncias químicas que são solúveis em água e/ou onde o efeito tóxico não é afetado pela diluição é previsto com precisão usando-se o método de teste FL[8]. Para categorizar uma substância química como solúvel em água, sob condições experimentais, ela deve ser solúvel em solução de sal estéril contendo cálcio (concentração de 1,0-1,8mM), livre de vermelho de fenol, solução salina tamponada de Hanks (HBSS) à concentração ≥250mg/mL (uma dose acima do limite de 100mg/mL). No entanto, se a substância de teste for solúvel abaixo da concentração de 100mg/mL, mas já produzir indução de FL de 20% nessa concentração (significando FL20<100mg/mL), ainda pode ser classificada como GHS Categoria 1 ou EPA Categoria 1.

11. As limitações identificadas para este método de teste excluem do domínio de aplicabilidade os ácidos e as bases fortes, fixadores de células e substâncias

químicas altamente voláteis. Estas substâncias químicas têm mecanismos que não são medidos pelo método de teste FL, como coagulação extensa, saponificação ou químicas reativas específicas. Outras limitações identificadas para este método baseiam-se nos resultados da capacidade preditiva da substância teste colorida e viscosa[8]. Sugere-se que os dois tipos de substâncias químicas sejam difíceis de remover da monocamada, após o curto período de exposição, e que a previsibilidade do método de teste poderia ser melhorada se fosse utilizado maior número de etapas de lavagem. As substâncias químicas sólidas suspensas em líquido têm a propensão de se precipitar e a concentração final nas células pode ser difícil de determinar. Quando substâncias dentro dessas classes químicas e físicas são excluídas do banco de dados, a precisão do FL nos sistemas de classificação da UE, da EPA e do GHS é substancialmente melhorada[8].

12. Com base na finalidade deste método de teste (identificar somente corrosivos oculares/irritantes severos), as taxas de falso negativo (ver parágrafo 13) não são críticas, pois tais substâncias serão posteriormente avaliadas com outros testes *in vitro* adequadamente validados ou em coelhos, dependendo dos requisitos regulatórios, usando uma estratégia de testes sequenciais em abordagem de peso de evidência[6] (ver também os parágrafos 3 e 4).

13. Outras limitações identificadas do método de teste FL são baseadas em taxas de falso negativo e falso positivo. Usada em etapa inicial, em abordagem descendente, para identificar substâncias e misturas solúveis como corrosivas/irritantes oculares severas (GHS Categoria 1; CLP Categoria 1; EPA Categoria I), a taxa de falso positivo para o método de teste FL variou de 7% (7/103; GHS e CLP) a 9% (9/99; EPA), enquanto a taxa de falso negativo variou de 54% (15/28; EPA) a 56% (27/48 GHS e CLP) comparados com resultados *in vivo*. Grupos químicos mostrando resultados falsos positivos e/ou falsos negativos no método de teste FL não são definidos aqui.

14. Certas limitações técnicas são específicas para a cultura de células MDCK. As junções estreitas que bloqueiam a passagem do corante de fluoresceína de sódio através da monocamada são cada vez mais comprometidas com o aumento do número de passagens celulares. A formação incompleta das junções estreitas resulta em aumento de FL no controle não tratado. Portanto, um vazamento máximo permissível definido nos controles não tratados é importante (ver parágrafo 38: 0% de vazamento). Tal como acontece com todos os ensaios *in vitro*, existe

potencial para as células se transformarem ao longo do tempo; então é vital que os intervalos de números de passagem para os ensaios sejam indicados.

15. O presente domínio de aplicabilidade pode ser aumentado em alguns casos, mas somente após a análise de um conjunto expandido de dados de substâncias de teste estudadas – preferencialmente atualizados através de testes[4]. Esta diretriz de teste será atualizada conforme novas informações e dados forem considerados.

16. Para qualquer laboratório que estabeleça inicialmente este ensaio, as substâncias químicas de proficiência fornecidas no anexo III devem ser usadas. Os laboratórios podem usar essas substâncias químicas para demonstrar sua competência técnica na realização do método de teste FL antes de enviar os dados do ensaio FL para fins de classificação de risco regulamentar.

PRINCÍPIO DO TESTE

17. O método de teste FL é um ensaio *in vitro* baseado em citotoxicidade e função celular realizado numa monocamada confluente de células epiteliais tubulares MDCK CB997, que crescem em inserções semipermeáveis e modelam o estado não proliferativo do epitélio córneo *in vivo*. A linha/contorno celular MDCK está bem estabelecida e forma junções estreitas desmossômicas semelhantes àquelas encontradas no lado apical dos epitélios conjuntivos e córneos. Junções estreitas e desmossômicas *in vivo* impedem que solutos e materiais estranhos penetrem no epitélio da córnea. A perda de impermeabilidade transepitelial, devido a junções estreitas e junções desmossômicas danificadas, é um dos primeiros eventos na irritação ocular induzida por produtos químicos.

18. A substância de teste é aplicada à camada confluente de células crescidas no lado apical da inserção. Uma exposição curta de 1 minuto é rotineiramente usada para refletir a taxa de depuração normal em exposições humanas. Uma vantagem do curto período de exposição é que as substâncias e misturas à base de água podem ser testadas puras, se puderem ser facilmente removidas após o período de exposição. Isto permite comparações mais diretas dos resultados com os efeitos químicos em humanos. A substância de teste é removida e o corante não tóxico, e altamente fluorescente, fluoresceína de sódio é adicionado no lado apical da monocamada durante 30 minutos. O dano causado pela substân-

cia de teste às junções estreitas é determinado pela quantidade de fluoresceína que vaza através da camada de célula em um período de tempo definido.

19. A quantidade de corante de fluoresceína de sódio que passa através da monocamada e da membrana de inserção para um volume fixo de solução presente no poço (para o qual o corante de fluoresceína de sódio vaza) é determinada medindo espectrofluorometricamente a concentração de fluoresceína no poço. A quantidade de vazamento de fluoresceína (FL) é calculada com referência às leituras de intensidade de fluorescência (FI) de dois controles: um controle em branco e um controle de vazamento máximo. A porcentagem de fuga e, por conseguinte, a quantidade de danos nas junções estreitas é expressa, em relação a estes controles, para cada uma das concentrações estabelecidas da substância de ensaio. Em seguida, o FL20 (isto é, concentração que causa 20% de FL em relação ao valor registrado para a monocamada confluente não tratada e inserções sem células), é calculado. O valor de FL20 (mg/mL) é utilizado no modelo de previsão para identificação de corrosivos oculares e irritantes graves (ver parágrafo 35).

20. A recuperação, uma parte importante do perfil de toxicidade de uma substância teste, é avaliada pelo teste de irritação ocular *in vivo*. Análises preliminares indicaram que os dados de recuperação (até 72h após a exposição química) podem potencialmente aumentar a capacidade preditiva do Protocolo INVITTOX 71; mas uma avaliação adicional é necessária e se beneficiaria tendo dados adicionais, preferencialmente advindos de testes adicionais[7]. Estas diretrizes de teste serão atualizadas conforme novas informações e dados forem considerados.

PROCEDIMENTO

Preparação da monocamada celular

21. A monocamada de células MDCK CB997 é preparada utilizando-se células subconfluentes que crescem em frascos de cultura celular em DMEM/Mix de Nutriente F12 (1x concentrado com L-glutamina, 15mM de HEPES, cálcio (na concentração de 1,0-1,8mM) e 10% FCS/FBS desativado por calor). É importante ressaltar que todos os meios/soluções utilizados ao longo do ensaio FL devem conter cálcio na concentração entre 1,8mM (200mg/L) e 1,0mM (111mg/L), para garantir a formação e a integridade da junção estreita. O número de passagens da célula deve ser controlado, para garantir formação uniforme e replicável de

junções estreitas. De preferência, as células devem estar dentro do intervalo de passagem 3-30 de descongelamento/derretimento, porque as células dentro dessa gama de passagem têm funcionalidade semelhante, o que ajuda os resultados do teste a serem reprodutíveis.

22. Antes de realizar o método de teste FL, as células são destacadas do frasco por tripsinização e centrifugadas; após, quantidade apropriada de células é semeada nas inserções colocadas em placas de 24 poços (ver anexo I). Pastilhas de 12mm de diâmetro com membrana de ésteres de celulose mista, na espessura de 80-150μm e com tamanho de poro de 0,45μm, devem ser usadas para semear as células. No estudo de validação, foram utilizadas inserções Millicell-HA de 12mm. As propriedades do tipo de inserção e membrana são importantes, pois podem afetar o crescimento celular e a ligação química. Certos tipos de substâncias químicas podem se ligar à membrana de inserção Millicell-HA, o que poderia afetar a interpretação dos resultados. Substâncias químicas de proficiência (ver anexo III) devem ser usadas para demonstrar a equivalência se outras membranas forem usadas.

23. A ligação química à membrana de inserção é mais comum para substâncias químicas catiônicas, como o cloreto de benzalcônio, que são atraídas para a membrana positivamente carregada[8]. A ligação química à membrana de inserção pode aumentar o período de exposição química, levando à superestimação do potencial tóxico da substância química, mas, também, pode reduzir fisicamente o vazamento de fluoresceína através da inserção, pela ligação do corante ao químico catiônico ligado à membrana de inserção, levando à subestimação do potencial tóxico do produto químico. Isto pode ser prontamente monitorado, expondo-se a membrana isolada à concentração mais alta do produto químico, depois, adicionando-se corante de fluoresceína de sódio à concentração normal, durante o tempo padrão (sem controle celular). Se ocorrer a ligação do corante de fluoresceína de sódio, a membrana de inserção aparece amarela após o material de teste ter sido lavado. Assim, é essencial conhecer as propriedades de ligação da substância de teste para poder interpretar o efeito da substância química nas células.

24. A semeadura celular nas inserções deve produzir uma monocamada confluente no momento da exposição química. 1,6 x 105 células devem ser adicionadas por inserção (400μL de uma suspensão celular com densidade de 4 x 105

células/mL). Sob essas condições, uma monocamada confluente é obtida após 96 horas em cultura. Inserções devem ser examinadas visualmente antes da semeadura, de modo a assegurar que qualquer dano registrado no controle visual descrito no parágrafo 30 seja devido ao manuseio.

25. As culturas de células MDCK devem ser mantidas em incubadoras em atmosfera úmida, a 5% ± 1% CO_2 e a 37 ± 1°C. As células devem estar livres de contaminação por bactérias, vírus, micoplasmas e fungos.

Aplicação dos substâncias químicas de teste e de controle

26. Deve ser preparada uma nova solução-base da substância teste para cada ensaio experimental, a ser utilizada no prazo de 30 minutos após a preparação. As substâncias de ensaio devem ser preparadas em HBSS para evitar a ligação às proteínas séricas contendo cálcio (na concentração de 1,0-1,8mM) livre de vermelho de fenol. A solubilidade do produto químico a 250mg/mL em HBSS deve ser avaliada antes do teste. Se, nessa concentração, o produto químico formar uma suspensão ou emulsão estável (isto é, mantiver a uniformidade e não se assentar ou separar em mais do que uma fase) durante 30 minutos, o HBSS pode ainda ser usado como solvente. No entanto, se o produto químico for insolúvel em HBSS, nessa concentração, o uso de outros métodos de teste, em vez de FL, deve ser considerado. O uso de óleo mineral leve como solvente, nos casos em que o produto químico é insolúvel em HBSS, deve ser considerado com cautela, pois não há dados disponíveis suficientes para concluir sobre o desempenho do ensaio FL sob tais condições.

27. Todas as substâncias químicas a serem testadas são preparadas em HBSS estéril, a partir da solução base contendo cálcio (na concentração de 1,0-1,8mM), livre de vermelho de fenol, em cinco concentrações fixas, diluídas em uma base de peso por volume: 1, 25, 100, 250mg/mL e uma solução pura ou saturada. Ao testar um produto químico sólido, uma concentração bem alta de 750mg/mL deve ser incluída. Essa concentração pode ter que ser aplicada nas células usando-se uma pipeta de deslocamento positivo. Se a toxicidade for encontrada entre 25 e 100mg/mL, as seguintes concentrações adicionais devem ser testadas duas vezes: 1, 25, 50, 75, 100mg/mL. O valor do FL20 deve ser derivado dessas concentrações, desde que os critérios de aceitação tenham sido atendidos.

28. As substâncias de teste são aplicadas às monocamadas de células confluentes após remoção do meio de cultura e dupla lavagem com HBSS estéril quente (37°C), contendo cálcio (na concentração de 1,0-1,8mM) e sem vermelho de fenol. Previamente, os filtros devem ter sido verificados visualmente quanto a danos preexistentes que poderiam ser falsamente atribuídos a possíveis incompatibilidades com substâncias químicas de teste. Devem utilizar-se, pelo menos, três réplicas para cada concentração da substância em estudo e para os controles em cada ensaio. Após 1 minuto de exposição, à temperatura ambiente, a substância de teste deve ser cuidadosamente removida por aspiração, a monocamada deve ser lavada duas vezes com HBSS estéril quente (37°C), contendo cálcio (na concentração de 1,0-1,8mM), sem vermelho de fenol, e o vazamento de fluoresceína deve ser imediatamente medido.

29. Controles negativos (NC) e positivos (PC) simultâneos devem ser usados, em cada execução, para demonstrar que a integridade da monocamada (NC) e a sensibilidade das células (PC) estão dentro de uma faixa de aceitação histórica definida. A substância química sugerida para PC é Brij 35 (CAS n° 9002-92-0) a 100mg/mL. Esta concentração deve dar aproximadamente 30% de vazamento de fluoresceína (faixa aceitável de 20 a 40% de vazamento de fluoresceína, ou seja, dano na camada celular). A substância química NC sugerida é HBSS (controle em branco, não tratado), contendo cálcio (na concentração de 1,0-1,8mM), sem vermelho de fenol. Um controle de vazamento máximo também deve ser incluído, em cada execução, para permitir o cálculo dos valores FL20. O vazamento máximo é determinado usando-se uma inserção de controle sem células.

Determinação da permeabilidade à fluoresceína

30. Imediatamente após a remoção das substâncias de teste e controle, são adicionados HBSS de 400µL de 0,1mg/mL de solução de sódio de fluoresceína (0,01% (p/v) [contendo cálcio a 1,0-1,8mM], livre de vermelho de fenol, para as inserções Millicell-HA. As culturas são mantidas durante 30 minutos, à temperatura ambiente. No final da incubação com fluoresceína, as inserções são cuidadosamente removidas de cada poço. A verificação visual é realizada em cada filtro e qualquer dano que possa ter ocorrido durante o manuseio é registrado.

31. A quantidade de fluoresceína que vazou através da monocamada e a inserção são quantificadas na solução que permaneceu nos poços após a remoção

das inserções. As medições são feitas em um espectrofluorômetro em comprimentos de onda de excitação e emissão de 485nm e 530nm, respectivamente. A sensibilidade do espectrofluorômetro deve ser ajustada de modo que exista a maior diferença numérica entre o máximo FL (inserção sem células) e o mínimo FL (inserção com monocamada confluente tratada com NC). Devido às diferenças no espectrofluorômetro utilizado, sugere-se que seja utilizada uma sensibilidade que forneça uma intensidade de fluorescência>4000 no controle máximo do vazamento de fluoresceína. O valor máximo de FL não deve ser maior do que 9,999. A intensidade máxima de vazamento de fluorescência deve estar dentro da faixa linear do espectrofluorômetro usado.

Interpretação de resultados e modelo de previsão

32. A quantidade de FL é proporcional aos danos induzidos por substâncias químicas nas junções estreitas. Calcula-se a percentagem de FL para cada concentração de produto químico testado a partir dos valores de FL, obtidos para a substância de teste com referência aos valores FL do NC (leitura da monocamada confluente de células tratadas com o NC) e um controle de fuga máxima (leitura para a quantidade de FL através de uma inserção sem células).

A intensidade média máxima de fluorescência de vazamento = x

A média de 0% de intensidade de fluorescência de vazamento (NC) = y

A média de 100% de vazamento é obtida subtraindo-se a média de 0% de vazamento da média máxima de vazamento

Isto é, x – y = z

33. O percentual de vazamento para cada dose fixa é obtido pela subtração do vazamento de 0% à intensidade de fluorescência média das três leituras de replicação (m) e pela divisão desse valor pelo valor do vazamento de 100%, isto é, %FL =[(m-y) / z] x 100%, onde:

m = a intensidade média de fluorescência das três medições replicadas para a concentração envolvida

%FL = a porcentagem da fluoresceína que vaza pela camada celular

34. A seguinte equação, para o cálculo da concentração química causando 20% de FL, deve ser aplicada:

FLD= [(A-B) / (C-B)] x (MC – MB) + MB

Onde:

D = % de inibição

A = % de dano (20% de vazamento de fluoresceína)

B = % vazamento de fluoresceína <A

C = % vazamento de fluoresceína >A

MC= % concentração (mg/ml) de C

MB= % Concentração (mg/ml) de B

35. O valor de corte do FL20, para previsão de substâncias químicas como corrosivas oculares ou irritantes severas, é dado abaixo:

FL_{20} (mg/ml)	**Cat. GHS**	**Cat. CLP**	**Cat. EPA**
≤ 100	Categoria 1	Categoria 1	Categoria I

36. O método de teste FL é recomendado apenas para a identificação de corrosivos oculares solúveis em água e irritantes graves (Categoria 1 do GHS, Categoria 1 do CLP, Categoria I da EPA) (ver parágrafos 1 e 10).

37. Para identificar substâncias químicas solúveis em água (substâncias e misturas[4,7,8] como "indutores de lesões oculares graves" (GHS e CLP, Categoria 1) ou como "corrosivos oculares ou irritantes graves" (EPA, Categoria I), a substância de ensaio deve induzir o valor FL20 ≤100mg/ml.

Aceitação dos resultados

38. O valor médio de vazamento máximo de fluoresceína (x) deve ser superior a 4.000 (ver parágrafo 31), a média de 0% de vazamento (y) deve ser igual ou inferior a 300 e a média de 100% de vazamento (z) deve estar entre 3.700 e 6.000.

39. Um teste é considerado aceitável se o controle positivo produzir 20% a 40% de dano à camada celular (medida como % de vazamento de fluoresceína).

DADOS E RELATÓRIO

Dados

40. Para cada ensaio, os dados de poços replicados individuais (por exemplo, valores de intensidade de fluorescência e percentagem calculada de dados de FL para cada substância de teste, incluindo classificação) devem ser relatados na forma de tabela. Além disso, as médias ± DP (Desvio-Padrão) de medições replicadas individuais em cada execução devem ser relatadas.

Relatório de Teste

41. O relatório de teste deve incluir as seguintes informações:

Substâncias de teste e controle

- Nomes químicos, como o nome estrutural usado pelo CAS, seguido de outros nomes, se conhecido
- Número CAS, se conhecido
- Pureza e composição da substância ou mistura (em porcentagem por peso), para a extensão que essa informação está disponível
- Propriedades físico-químicas relevantes para conduzir o estudo (como estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, solubilidade na água, classe química)
- Tratamento da substância de teste/controle antes do teste, se aplicável (como aquecimento)
- Condições de armazenamento

Justificativa do método de teste e do protocolo usados

- Deve incluir considerações sobre a aplicabilidade e limitações do método de teste

Condições de teste

- Descrição do sistema de células usado, incluindo certificado de autenticidade e o status de micoplasma da linhagem celular
- Detalhes sobre o procedimento de teste usado
- Concentração da substância teste usada
- Duração da exposição à substância teste

- Duração da incubação com fluoresceína
- Descrição de quaisquer modificações do procedimento teste
- Descrição do critério de avaliação usado
- Referência a dados históricos do modelo (como controles positivos e negativos, substâncias químicas de referência, se aplicável)
- Informação sobre a proficiência técnica demonstrada pelo laboratório

Resultados

- Tabulação de dados das substâncias teste e controles individuais para cada ensaio e cada medição replicada (incluindo resultados individuais, médias e desvios-padrões)
- A classificação derivada com referência ao modelo de previsão e/ou critério de decisão usado
- Descrição de outros efeitos observados

Discussão dos resultados

- Deve incluir considerações sobre um resultado não conclusivo (parágrafo 35: FL20>100mg/ml) e mais testes

Conclusões

LITERATURA

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) EC (2008), Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union L353, 1-1355.

(3) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(4) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/ cell-function based in vitro assays for eye irritation testing. Available under Publications at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) Scott, L. et al. (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, Toxicol. In Vitro 24, 1-9.

(6) OECD (2002), Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264070646-en

(7) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Available at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu]

(8) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing. Available under Validation Study Documents, Section Eye Irritation at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

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

(10) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No.263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ANEXO 1

Diagrama do crescimento de células mdck em uma membrana de inserção para o método de teste FL

Uma camada confluente de células MDCK é cultivada na membrana semipermeável de uma inserção. As inserções são colocadas nos poços de 24 placas de poço.

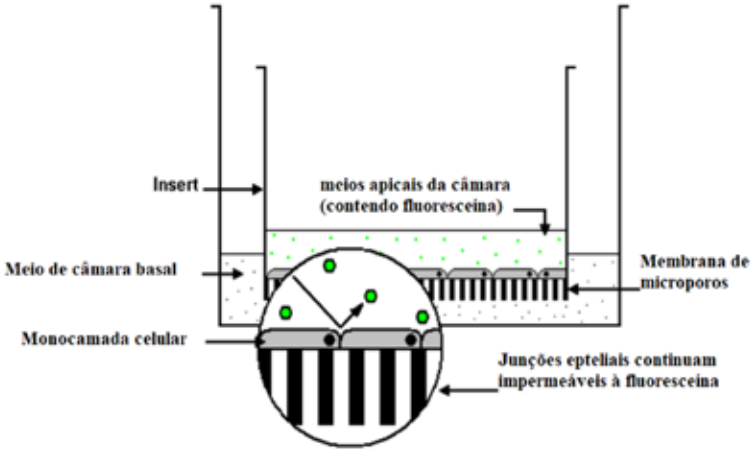


Figura tirada de : Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

ANEXO II

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de "relevância". O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância", para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste.

Categoria I EPA: substâncias químicas que produzem corrosão (destruição irreversível do tecido ocular) ou envolvimento/irritação da córnea que persiste por mais de 21 dias[4].

UE CLP (Regulamento da Comissão Europeia sobre a Classificação, Rotulagem e Embalagem de Substâncias e Misturas): implementa, na União Europeia (UE), o sistema GHS da ONU para a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas)[3].

Taxa de Falso Negativo: a proporção de substâncias químicas positivas falsamente identificadas por um método de teste como negativas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Taxa de Falso Positivo: a proporção de substâncias químicas negativas que são falsamente identificadas por um método de teste como positivas. É um indicador do desempenho do método de teste.

FL20: pode ser estimado pela determinação da concentração na qual a substância química testada causa 20% do vazamento de fluoresceína através da camada celular.

Vazamento de fluoresceína: a quantidade de fluoresceína que passa através da camada celular, medida espectrofluorometricamente.

GHS (Sistema Global de harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas pelas Nações Unidas – ONU): um sistema que propõe a classificação das substâncias químicas (substâncias e misturas) de acordo com os tipos e os níveis padronizados de riscos físicos, sanitários e ambientais, abordando os elementos de comunicação correspondentes, tais como pictogramas, palavras de aviso, declarações de perigo, recomendações de precaução e fichas de segurança, para transmitir informações sobre seus efeitos adversos, com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o meio ambiente[2].

Categoria 1 GHS: produção de dano ocular, ou grave decaimento físico da visão, após a aplicação de uma substância de teste na superfície anterior do olho, que não é totalmente reversível dentro de 21 dias da aplicação.

Risco: propriedade inerente de um agente ou situação que tem o potencial de causar efeitos adversos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto a esse agente.

Mistura: usado no contexto do GHS da ONU[2] como uma mistura ou solução composta de duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem.

Controle Negativo: uma réplica não tratada contendo todos os componentes de

um sistema de teste. Esta amostra é processada com amostras tratadas com substância de teste e outras amostras de controle para determinar se o solvente interage com o sistema de teste.

Não classificado: substâncias químicas que não são classificadas como Categorias 1, 2A ou 2B, do GHS da ONU; Categorias 1 ou 2, do CLP da UE; ou irritantes oculares das categorias I, II ou III, da EPA dos EUA[2-4].

Corrosivo ocular: (a) uma substância química que causa danos irreversíveis ao tecido ocular; (b) substâncias químicas classificadas como GHS ONU Categoria 1; Categoria 1 do CLP da UE; ou irritantes oculares da Categoria I da EPA dos EUA[2-4].

Irritante ocular: (a) uma substância química que produz mudança reversível no olho após a aplicação na superfície anterior do olho; (b) substâncias químicas classificadas como Categorias 2A ou 2B do GHS da ONU; Categoria 2 do CLP da UE; ou Categorias II ou III da EPA nos EUA, irritantes oculares[2-4].

Irritação ocular severa: (a) uma substância química que causa dano ocular após aplicação na superfície anterior do olho que não é reversível dentro de 21 dias após a aplicação ou provoca grave decaimento físico da visão; (b) substâncias químicas classificadas como GHS ONU Categoria 1; Categoria 1 do CLP da UE; ou irritantes oculares da Categoria I da EPA dos EUA[2-4].

Controle Positivo: um replicado contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância química conhecida por induzir resposta positiva. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser extrema.

Substâncias químicas de proficiência: um subconjunto da lista de substâncias químicas de referência que pode ser usado por um laboratório para demonstrar a proficiência com o método de teste de referência validado.

Relevância: descrição da relação do teste com o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a forma que o teste mede ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[9].

Confiabilidade: medidas da extensão em que um método de teste pode ser executado reprodutivamente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, quando realizado usando-se o mesmo protocolo. Avalia-se calculando a reprodutibilidade intra e interlaboratorial e a replicabilidade intralaboratorial.

Teste de substituição: um teste projetado para substituir um teste que está em uso rotineiro e aceito, para identificação de perigo e/ou avaliação de risco, e que foi determinado para fornecer proteção equivalente ou melhorada da saúde humana ou animal ou do meio ambiente, conforme aplicável, comparado para o teste aceito, para todas as possíveis situações de teste e substâncias químicas.

Sensibilidade: a proporção de todas as substâncias químicas positivas/ativas que são classificadas corretamente pelo teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[9].

Danos oculares sérios: é a produção de dano ao tecido ocular, ou grave decaimento físico da visão, após a aplicação de uma substância de teste na superfície anterior do olho, que não é totalmente reversível dentro de 21 dias da aplicação.

Controle de veículo/solvente: uma amostra não tratada contendo todos os componentes de um sistema de teste, incluindo o solvente ou veículo que é processado com as amostras tratadas e outras amostras de controle para estabelecer a resposta de linha de base para as amostras tratadas com a substância de teste dissolvida no mesmo solvente ou veículo. Quando testado com um controle negativo concorrente, esta amostra também demonstra se o solvente ou se veículo interage com o sistema de teste.

Especificidade: a proporção de todas as substâncias químicas negativas/inativas que são classificadas corretamente pelo teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste.

Substância: usado no contexto do GHS da ONU como elemento químico e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo usado, mas excluindo qualquer

solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou alterar sua composição.

Estratégia de testes escalonados: uma estratégia de teste escalonada, onde todas as informações existentes sobre uma substância de teste são revisadas, em uma ordem especificada, usando um processo de peso de evidência em cada camada para determinar se há informações suficientes disponíveis para a decisão de classificação de perigo antes da progressão para a próxima camada. Se o potencial de irritação de uma substância de teste puder ser atribuído com base nas informações existentes, nenhum teste adicional é necessário. Se o potencial de irritação de uma substância de teste não puder ser atribuído com base na informação existente, um procedimento de teste sequencial em etapas passo a passo é realizado até que uma classificação inequívoca possa ser feita.

Método de teste validado: um método de teste para o qual os estudos de validação foram concluídos para determinar a relevância (incluindo precisão) e confiabilidade para um propósito específico. É importante notar que um método de teste validado pode não ter desempenho suficiente, em termos de precisão e confiabilidade, para ser considerado aceitável para o propósito proposto[9].

Peso da evidência: o processo de considerar os pontos fortes e fracos de várias informações para alcançar e apoiar uma conclusão sobre o potencial de risco de uma substância química.

ANEXO III

Substâncias químicas de proficiência para método de teste FL

Antes do uso rotineiro de um método de teste que atenda a estas Diretrizes, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica identificando corretamente a classificação de corrosividade ocular das 8 substâncias químicas recomendadas na tabela 1. Essas substâncias químicas foram selecionadas para representar a faixa de respostas para irritação local/corrosão, que é baseada nos resultados do teste de olho de coelho in vivo (TG 405) (isto é, Categorias 1, 2A, 2B, ou Nenhuma Categoria de acordo com o GHS e o CLP[1,2,6]. No entanto, considerando a utilidade validada do ensaio FL (para identificar apenas corrosivos oculares/irritantes severos), existem apenas dois resultados de teste para fins de classificação (corrosivo/

irritante grave ou não corrosivo/irritante não grave) para demonstrar proficiência. Outros critérios de seleção são: substâncias químicas estão disponíveis comercialmente; há dados de referência in vivo de alta qualidade disponíveis; e há dados de alta qualidade do método de teste FL. Por esta razão, os químicos de proficiência foram selecionados a partir do "Documento de Revisão de Fundo do Ensaio de Vazamento de Fluoresceína como um Método Alternativo para Teste de Irritação do Olho"[8], que foi utilizado para a validação retrospectiva do método de teste FL.

Tabela 1: Substâncias químicas recomendadas para demonstrar proficiência técnica com FL

Substância Química	CASNR	Classe Química [1]	Estado físico	Classificação *in vivo*[2]	Classificação *in vitro*[3]
Cloreto de Benzalcônico (5%)	8001-54-5	Composto ônico	Líquido	Categoria 1	Corrosivo/Irritante severo
Cloridrato de prometazina	58-33-3	Amina, Amidina, Heterocíclico, composto orgânico de enxofre	Sólido	Categoria 1	Corrosivo/Irritante severo
Hidróxido de Sódio	1310-73-2	Alcalino	Líquido	Categoria 1	Corrosivo/Irritante severo
Lauril sulfato de sódio (15%)	151-21-3	Ácido carboxílico (sal)	Líquido	Categoria 1	Corrosivo/Irritante severo
4-carboxibenzal-deído	619-66-9	Ácido carboxílico, aldeído	Sólido	Categoria 2 (A)	Não corrosivo/não irritante severo
Nitrato de amônia	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólido	Categoria 2 (A)	Não corrosivo/ não irritante severo
Etil-2-metilaceto--acetato	609-14-3	Cetona, Éster	Líquido	Categoria 2 (B)	Não corrosivo/não irritante severo
Glicerol	56-81-5	Álcool	Líquido	Sem categoria	Não corrosivo/não irritante severo

Abreviações: n° CAS = Chemical Abstracts Service Registry Number

[1]Classes químicas foram atribuídas a cada substância de teste usando-se um esquema de classificação padrão, com base no sistema de classificação da MeSH (Cabeçalhos de Assuntos Médicos da Biblioteca Nacional de Medicina) (disponível em http//www.nlm.nih.gov/mesh)

[2] Baseado nos resultados do teste *in vivo* em olho de coelho (OECD TG 405) e usando-se o GHS e o CLP (1,2,6).

[3] Baseado nos resultados obtidos com FL (INVITTOX N° de protocolo 71).

Adotado: 25 de Junho de 2018

Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 491

Método de teste in vitro de exposição a curto prazo para identificação de:

I) substâncias químicas que produzem danos graves ao olho e

II) produtos químicos que não requerem classificação para irritação ocular ou dano sério ao olho

INTRODUÇÃO

1. O método de teste de exposição a curto prazo (Short Time Exposure/STE, em inglês) é um método *in vitro* que pode ser usado sob certas circunstâncias, e com limitações específicas, para a classificação e a rotulagem de substâncias químicas (substâncias e misturas) que induzem danos oculares graves, bem como aquelas que não necessitam de classificação para danos oculares graves ou irritação ocular, conforme definido pelo Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS) das Nações Unidas (ONU)[(1)].

2. Durante muitos anos, o potencial de risco, para os olhos, de substâncias químicas foi avaliado principalmente usando-se um teste em olho de coelho *in vivo* (TG 405). É aceito que, no futuro previsível, nenhum teste alternativo *in vitro* será capaz de substituir totalmente o teste em olho de coelho *in vivo* para prever toda a gama de respostas graves a lesões oculares/irritação ocular para diferentes classes químicas. No entanto, combinações estratégicas de métodos de teste alternativos, usados em uma planificação de teste (em camadas), podem substituir totalmente o teste em olho de coelho[(2)]. A abordagem de cima para baixo (Top--Down, em inglês) é projetada para o teste de substâncias químicas dos quais se supõe, com base nas informações existentes, ter alto potencial de irritação ou induzir sérios danos aos olhos. Por outro lado, a abordagem de baixo para cima é projetada para o teste de substâncias químicas, com base nas informações existentes, dos quais não se espera que causem irritação ocular suficiente para exigir uma classificação. Embora o método de teste STE não seja considerado um substituto completo para o teste em olho de coelho in vivo, ele é adequado para uso como parte de uma estratégia de teste hierárquico para classificação e rotulagem regulatória, como a abordagem de baixo para cima (bottom-up), para identificar, sem testes adicionais: (i) substâncias químicas indutoras de da-

nos oculares graves (UN GHS Categoria 1) e (ii) substâncias químicas (excluindo substâncias altamente voláteis e todas as substâncias químicas sólidas que não sejam surfactantes) que não exigem classificação para irritação ocular ou dano ocular grave (UN GHS Nenhuma Categoria)[1,2]. No entanto, uma substância química para a qual não esteja previsto causar danos sérios aos olhos (UN GHS Categoria 1), nem UN GHS nenhuma Categoria (não induz dano ocular grave ou irritação ocular), pelo método de teste STE, exigirá testes adicionais para estabelecer uma classificação definitiva. Além disso, as autoridades reguladoras competentes devem ser consultadas antes de utilizar o STE numa abordagem ascendente, sob o regime de classificação diferente do GHS ONU. A escolha do método de ensaio mais apropriado e a utilização de Teste devem ser vistos no contexto do Documento de Orientação da OECD sobre Abordagens Integradas de Ensaio e Avaliação para Danos Oculares Graves e Irritação Ocular[14].

3. O objetivo desta Diretriz (TG) é descrever os procedimentos usados para avaliar o potencial de risco ocular de uma substância química teste, com base em sua capacidade de induzir citotoxicidade no método de Teste de Exposição Curta. O efeito citotóxico das substâncias químicas nas células epiteliais da córnea é um importante modo de ação (MOA), que causa danos ao epitélio da córnea e irritação ocular. A viabilidade celular no método de teste STE é avaliada pela medição quantitativa, após a extração das células, do sal azul de formazam produzido pelas células vivas por conversão enzimática do corante vital MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)). Brometo de -2,5-difeniltetrazólio), também conhecido como brometo de tiazolil azul de tetrazólio[3]. A viabilidade celular obtida é comparada com o controle do solvente (viabilidade relativa) e utilizada para estimar o potencial de risco para os olhos. Uma substância química de teste é classificada como UN GHS Categoria 1 quando ambas as concentrações, de 5% e 0,05%, resultam em uma viabilidade celular $\leq$70%. Por outro lado, uma substância química é avaliada como UN GHS Nenhuma Categoria quando as concentrações de 5% e 0,05% resultam em uma viabilidade celular $>$70%.

4. O termo “substância química de teste” é utilizado nesta Diretriz para se referir ao que é testado e não está relacionado à aplicabilidade do método de teste STE ao teste de substâncias e/ou misturas. As definições são fornecidas no anexo I.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

5. Esta Diretriz é baseada em um protocolo desenvolvido pela Kao Corporation[4], que foi objeto de dois estudos de validação diferentes: um pelo Comitê de Validação da Sociedade Japonesa para Experimentos Alternativos a Animais (JSAAE)[5] e outro pelo Centro Japonês de Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM)[6]. Uma revisão por pares foi conduzida pelo NICEATM/ICCVAM com base nos relatórios do estudo de validação e nos documentos de revisão de base sobre o método de teste[7].

6. Quando usado para identificar substâncias químicas (substâncias e misturas) que causam danos oculares graves (UN GHS Categoria 1)[1], os dados obtidos com o método de teste STE em 125 substâncias químicas (incluindo substâncias e misturas) mostraram precisão geral de 83% (104/125), taxa de falsos positivos de 1% (1/86) e taxa de falsos negativos de 51% (20/39) – em comparação com o teste em olho de coelho *in vivo*[7]. A taxa de falso negativo obtida não é crítica no contexto atual, uma vez que todas as substâncias químicas de teste, que induzem viabilidade celular $\leq$70%, em uma concentração de 5%, e $>$70%, em concentração de 0,05%, deverão ser posteriormente testadas com outros métodos de teste *in vitro* adequadamente validados; ou, como última opção, no teste em olho de coelho *in vivo*, dependendo dos requisitos regulamentares e de acordo com a estratégia de teste sequencial e as abordagens de peso de evidência recomendadas no momento[1,8]. Principalmente substâncias monoconstituintes foram testadas, embora exista também quantidade limitada de dados sobre o teste de misturas. Apesar de tudo, este método é tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multiconstituintes. Ao considerar o teste de misturas, substâncias químicas difíceis de testar (instáveis) ou substâncias químicas de teste, não claramente dentro do domínio de aplicabilidade descrito nesta Diretriz, deve-se considerar se os resultados de tais testes produzirão dados que sejam significativos cientificamente. O método de teste STE não apresentou outras deficiências específicas quando usado para identificar substâncias químicas de teste como Categoria 1 do GHS da ONU. Investigadores podem considerar usar este método de teste, pelo qual a viabilidade celular $\leq$70%, na concentração de 5% e 0,05%, deve ser aceita como indicativo de resposta que induza dano ocular grave – que deve ser classificado como Categoria 1 do GHS da ONU sem mais outros testes.

7. Quando utilizados para identificar substâncias químicas (substâncias e misturas) que não exijam classificação para irritação ocular e lesões oculares graves

(ou seja, UN GHS NºCategory), os dados obtidos com o método STE, em 130 substâncias químicas (incluindo substâncias e misturas), revelaram precisão de 85% (110/130), taxa de falso negativo de 12% (9/73) e taxa de falsos positivos de 19% (11/57) – em comparação ao teste em olho de coelho *in vivo*[7]. Se substâncias altamente voláteis e outras substâncias sólidas, que não os tensoativos, forem excluídas do conjunto de dados, a precisão global melhora para 90% (92/102), a taxa de falsos negativos para 2% (1/54) e o falso positivo para 19% (9/48)[7]. Como consequência, as deficiências potenciais do método de teste STE, quando usado para identificar substâncias químicas de teste que não exijam classificação para irritação ocular e lesões oculares graves (UN GHS NºCategory), são as altas taxas de falsos negativos para i) substâncias altamente voláteis, com pressão de vapor acima de 6 kPa, e ii) substâncias químicas sólidas (substâncias e misturas) que não sejam surfactantes e misturas compostas apenas de surfactantes. Tais substâncias químicas são excluídas do domínio de aplicabilidade do método de teste STE[7].

8. Além das substâncias químicas mencionadas nos parágrafos 6 e 7, o conjunto de dados gerado pelo método de teste STE também contém dados internos de 40 misturas que, quando comparados com o teste *in vivo* em olho de Draize, mostraram precisão de 88% (35/40), taxa de falso positivo de 50% (5/10) e taxa de falso negativo de 0% (0/30) para predizer misturas que não requerem classificação no sistema de classificação do GHS da ONU[9]. O método de teste STE pode, portanto, ser aplicado para identificar misturas como UN GHS Nenhuma Categoria, em uma abordagem de baixo para cima, com exceção de misturas sólidas, além daquelas compostas apenas de surfactantes, como uma extensão de sua limitação a substâncias sólidas. Portanto, as misturas contendo substâncias com pressão de vapor superior a 6 kPa devem ser avaliadas com cuidado para evitar possíveis subestimações e devem ser justificadas caso a caso.

9. O método de teste STE não pode ser usado para a identificação de substâncias químicas de teste, como UN GHS Categoria 2, Categoria 2A (irritação ocular) ou UN GHS Categoria 2B (irritação leve dos olhos), devido ao número considerável de substâncias químicas UN GHS Categoria 1 subestimado como UN GHS Categoria 2, 2A, ou 2B e de substâncias químicas UN GHS Não Categorias subestimado como UN GHS Categoria 2, 2A ou 2B[7]. Para este propósito, testes adicionais com outro método adequado podem ser necessários.

10. O método de teste STE é adequado para substâncias químicas que são dissolvidas ou uniformemente suspensas por, pelo menos, 5 minutos em soro fisiológico, 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em solução salina ou óleo mineral. O método de teste STE não é adequado para substâncias químicas de teste que são insolúveis ou que não podem ser uniformemente suspensas por, pelo menos, 5 minutos em soro fisiológico, 5% de DMSO em solução salina ou óleo mineral. O uso de óleo mineral no método de teste STE é possível, devido à exposição de curta duração. Por conseguinte, o método de teste STE é adequado para prever o potencial de risco ocular de substâncias químicas de teste insolúveis em água (por exemplo, álcoois graxos de cadeia longa ou cetonas) desde que sejam miscíveis em, pelo menos, um dos três solventes acima propostos[4].

11. O termo "substância química de teste" é utilizado nesta Diretriz para se referir ao que está sendo testado e não está relacionado à aplicabilidade do método de teste STE ao teste de substâncias e/ou misturas.

12. O método de teste STE é um ensaio *in vitro* baseado em citotoxicidade que é realizado em uma monocamada confluente de células Statens Serum Institut Rabbit Cornea (SIRC), cultivadas em uma microplaca de policarbonato de 96 poços[4]. Após cinco minutos de exposição a uma substância química em teste, a citotoxicidade é medida quantitativamente, como a viabilidade relativa das células SIRC, usando-se o ensaio MTT[4]. A viabilidade celular diminuída é usada para prever potenciais efeitos adversos que levam a danos oculares.

13. Foi relatado que 80% de uma solução aplicada em olho de coelho é excretada através do saco conjuntival dentro de três a quatro minutos, enquanto que mais de 80% de uma solução injetada no olho humano é excretada dentro de um a dois minutos[10]. O método de teste STE tenta aproximar esses tempos de exposição e faz uso da citotoxicidade como um ponto final para avaliar a extensão dos danos às células SIRC, após a exposição por cinco minutos à substância química em teste.

DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA

14. Antes do uso rotineiro do método de teste STE, descrito nesta Diretriz de Teste, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, classificando correta-

mente as onze substâncias recomendadas na tabela 1. Essas substâncias foram selecionadas para representar toda a gama de respostas para lesões oculares graves ou irritações oculares graves com base nos resultados dos testes de olho de coelho *in vivo* (TG 405) e do sistema de classificação UN GHS(1). Outros critérios de seleção foram incluídos, como: as substâncias serem comercialmente disponíveis; os dados de referência *in vivo* de alta qualidade devem estar disponíveis; e os dados *in vitro* de alta qualidade obtidos pelo método de teste STE deveriam estar disponíveis(3). Em situações em que uma substância listada não esteja disponível, ou seja, justificável, poderá ser usada outra substância para a qual estejam disponíveis dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro*, desde que sejam utilizados os mesmos critérios descritos aqui.

Tabela 1: Lista de substâncias de proficiência

Substância	**CASRN**	**Classe Química[1]**	**Estado físico**	**Categoria *in vivo* da GHS UN[2]**	**Solvente no teste STE**	**Categoria STE da GHS UN**
Cloreto de benzalcônio (10% aquoso)	8001-54-5	Composto oniônico	Líquido	Categoria 1	Salino	Categoria 1
Triton X-100 (100%)	9002-93-1	Éter	Líquido	Categoria 1	Salino	Categoria 1
Vermelho ácido 92	18472-84-2	Composto heterocíclico; Composto de bromo; Composto de Cloro	Sólido	Categoria 2A1	Salino	Categoria 1
Hidróxido de Sódio	1310-73-2	Álcali; substância química inorgânica	Sólido	Categoria 1[3]	Salino	Categoria 1
Butirolactona	96-48-0	Lactona; Composto Heterocíclico	Líquido	Categoria 2A1	Salino	Não se pode fazer previsões
l-Octanol	111-87-5	Álcool	Líquido	Categoria 2A/B[4]	Óleo Mineral	Não se pode fazer previsões
Ciclopentatol	96-41-3	Álcool; hidrocarboneto; cíclico	Líquido	Categoria 2A/B[5]	Salino	Não se pode fazer previsões
Acetato de 2-etoxietilo	111-15-9	Álcool; Éter	Líquido	Sem categoria	Salino	Sem categoria

Substância	CASRN	Classe Química[1]	Estado físico	Categoria *in vivo* da GHS UN[2]	Solvente no teste STE	Categoria STE da GHS UN
Dodecano	112-40-3	Hidrocarboneto, acíclico	Líquido	Sem categoria	Óleo Mineral	Sem categoria
Metil isobutil cetona	108-10-1	Cetona	Líquido	Sem categoria	Óleo Mineral	Sem categoria
Sulfato de n, n-dimetilguanidina	598-65-2	Amidina, composto de enxofre	Sólido	Sem categoria	Salino	Sem categoria

Abreviaturas: CAS RN = Número do Registro do Chemical Abstracts Service

[1] As classes de substâncias químicas foram atribuídas usando-se informações obtidas de publicações anteriores do NICEATM e, se não estiverem disponíveis, usando-se o Medical Subject Headings (MeSH®) da National Library of Medicine (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponível em http: //chem.sis .nlm.nih.gov / chemidplus /) e determinações de estrutura feitas pelo NICEATM.

[2] Com base nos resultados do teste em olho de coelho in vivo (OECD TG 405) e utilizando o GHS da ONU(1).

[3] A classificação de Categoria1 baseia-se no potencial corrosivo da pele de 100% de hidróxido de sódio (listado como substância química de proficiência, com potencial corrosivo para a pele na OECD TG 435) e no critério da categoria 1 do GHS da ONU(1).

[4] A classificação como 2A ou 2B depende da interpretação do critério do GHS da ONU para distinguir entre essas duas categorias, ou seja, dois de seis vs quatro de seis animais com efeitos no sétimo dia, necessários para gerar uma classificação de Categoria 2A. O conjunto de dados in vivo incluiu dois estudos com três animais cada. Em um estudo, dois de três animais apresentaram efeitos no sétimo dia, garantindo um com classificação CAT.2A(11), enquanto que, no segundo estudo, todos os end points nos três animais recuperaram a pontuação de zero no sétimo dia, garantindo um CAT. Classificação 2B(12).

[5] A classificação como 2A ou 2B depende da interpretação do critério do GHS da ONU para distinguir entre essas duas categorias, ou seja, um de três vs dois de três animais com efeitos no sétimo dia são necessários para gerar a classificação de Categoria 2A. O estudo in vivo incluiu três animais. Todos os extremos, para além da opacidade da córnea e vermelhidão da conjuntiva num animal, recuperaram uma pontuação de zero no sétimo dia ou no anterior. O único animal que não se recuperou completamente no sétimo dia tinha opacidade corneana que foi totalmente recuperada no dia 14(11).

Preparação da monocamada celular

15. A linhagem de células da córnea de coelho, SIRC, deve ser usada para executar o método de teste STE. Recomenda-se que as células SIRC sejam obtidas de um banco de células bem qualificado, como o American Type Culture Collection CCL60.

16. As células SIRC são cultivadas a 37°C, sob 5% de CO_2 e atmosfera umidificada num frasco de cultura, contendo meio de cultura composto por meio essencial mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 2mM de L-glutamina, 50 a 100 unidades/mL de penicilina e 50 a 100mg/mL de estreptomicina. As células que se tornaram confluentes no frasco de cultura devem ser separadas, utilizando solução de ácido tripsina-etilenodiaminotetracético, com ou sem o uso de um raspador de células. As células são propagadas (por exemplo, 2 a 3 passagens) em um frasco de cultura, antes de serem empregadas para testes de rotina, e devem passar por não mais do que 25 passagens de descongelamento.

17. Células prontas para serem usadas no teste STE são preparadas na densidade apropriada e semeadas em placas de 96 poços. A densidade de semeadura celular recomendada é de 6,0x103 células por poço, quando as células são usadas quatro dias após a semeadura – ou 3,0 × 103 células por poço, quando as células são usadas cinco dias após a semeadura –, em volume de cultura de 200*µ*L. As células utilizadas para o teste STE, que são semeadas num meio de cultura na densidade apropriada, atingirão confluência superior a 80%, no momento do teste, ou seja, quatro ou cinco dias após a semeadura.

Aplicação das substâncias químicas de teste e substâncias de controle

18. A primeira escolha de solvente para dissolver ou suspender substâncias químicas de teste é a solução salina fisiológica. Se a substância química de teste demonstrar baixa solubilidade ou não puder ser dissolvida ou suspensa uniformemente por, pelo menos, cinco minutos em solução salina, 5% de DMSO (CAS # 67-68-5) em solução salina são usados como solvente de segunda escolha. Para substâncias químicas de teste que não podem ser dissolvidas ou suspensas uniformemente por, pelo menos, cinco minutos em soro fisiológico ou 5% de DMSO em solução salina, o óleo mineral (CAS # 8042-47-5) é usado como solvente de terceira escolha.

19. As substâncias químicas de teste são dissolvidas ou suspensas uniformemente no solvente selecionado a 5% (p/p) de concentração e ainda diluídas por diluição serial de 10 vezes a 0,5% e concentração de 0,05%. Cada substância química em teste deve ser testada em concentrações de 5% e 0,05%. As células cultivadas na placa de 96 poços são expostas a 200*µ*L/poço de uma concentração de 5% ou 0,05% da solução química de teste (ou suspensão), durante cinco minutos, à temperatura ambiente. As substâncias químicas de ensaio (substân-

cias monoconstituintes ou substâncias ou misturas multiconstituintes) são consideradas substâncias puras e diluídas ou suspensas, de acordo com o método, independentemente da sua pureza.

20. O meio de cultura descrito no parágrafo 15 é usado como controle médio em cada placa de cada repetição. Com isso, as células devem ser expostas também a amostras de controle de solvente em cada placa de cada repetição. Os solventes listados no parágrafo 17 foram confirmados como não tendo efeitos adversos na viabilidade das células SIRC.

21. No método do teste STE, o lauril sulfato de sódio (SLS) a 0,01% em solução salina deve ser usado como controle positivo em cada placa de cada repetição. Para calcular a viabilidade celular do controle positivo, cada placa de cada repetição deve incluir também um controle de solvente salino.

22. Um branco/vazio é necessário para determinar a compensação da densidade óptica e deve ser realizado em cavidades contendo meio de cultura ou solução salina tamponada com fosfato, mas sem células ou cálcio e magnésio (PBS-) ou células.

23. Cada amostra (teste químico a 5% e 0,05%, controle médio, controle com solvente e controle positivo) deve ser testada em triplicata em cada repetição, expondo as células a 200μl da substância química de teste apropriado ou da substância química de controle durante cinco minutos, à temperatura ambiente.

24. As substâncias de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de substâncias químicas desconhecidas, de uma substância química específica ou de uma classe de produtos, ou para avaliar o potencial relativo de irritação de um irritante ocular dentro de uma faixa específica de respostas irritantes.

Medição de Viabilidade Celular

25. Após a exposição, as células são lavadas duas vezes com 200μL de PBS e adicionam-se 200μL de solução de MTT (0,5mg MTT/mL de meio de cultura). Após período de reação de duas horas em uma incubadora (37°C, 5% CO_2), a solução MTT é decantada, o MTT formazan é extraído pela adição de 200μL de ácido clorídrico 0,04 N-isopropanol por 60 minutos no escuro, à temperatura ambiente, e a absorvência da solução de MTT formazan é medida a 570nm com um

leitor de placas. A interferência de substâncias químicas de teste com o ensaio MTT (por corantes ou redutores diretos de MTT) somente ocorre se quantidade significativa de substância química de teste for retida no sistema de teste, após o enxágue seguido da exposição. Embora este seja, frequentemente, o caso da córnea humana reconstruída em 3D ou da epiderme humana reconstituída, é menos provável que ocorra nas culturas de células 2D utilizadas para o método de teste STE. No entanto, como o material residual de corantes ou redutores MTT diretos pode interferir na medição da densidade óptica, os usuários do STE devem avaliar esses resultados com cautela. Se o teste resultar em uma previsão de Categoria 1, nenhuma outra ação será necessária para abordar possíveis interferências. Quando possível, os dados devem ser gerados para determinar se tal interferência está ocorrendo (conduzindo uma experiência para comparar medições de DO de ensaio MTT de poços tratados com artigo de teste contendo células SIRC em comparação com poços tratados com artigo de teste contendo nenhuma célula). Se for esperado que a interferência MTT afete os resultados, podem ser utilizados ensaios de citotoxicidade alternativos (como vermelho neutro), desde que se demonstre que estes proporcionam resultados semelhantes aos do ensaio MTT, como testar as substâncias de proficiência na tabela 1, se dados históricos estiverem disponíveis para derivar critérios de aceitação de execução comparáveis (ver parágrafo 29).

Interpretação de Resultados e Modelo de Predição

26. Os valores da densidade óptica (DO) obtidos para cada substância química em teste são então utilizados para calcular a viabilidade celular em relação ao controle do solvente, que é estabelecido em 100%. A viabilidade celular relativa é expressa como uma percentagem e obtida dividindo-se a DO da substância química de teste pela DO do solvente de controle, após subtrair a DO de branco/vazio de ambos os valores.

$$\frac{\text{(DO570 da substância química em teste) - (DO570 de branco)}}{\text{(DO570 do solvente de controle) - (DO570 de branco)}} * 100$$

Da mesma forma, a viabilidade celular relativa de cada solvente de controle é expressa como uma porcentagem e obtida dividindo-se a DO de cada controle de solvente pela de controle média, após subtrair a DO de branco de ambos os valores.

27. Três repetições independentes, cada uma contendo três poços replicados (ou seja, n=9), devem ser realizadas. A média aritmética dos três poços para cada teste químico e controle de solvente, em cada repetição independente, é usada para calcular a média aritmética da viabilidade celular relativa. A média aritmética final da viabilidade celular é calculada a partir das três repetições independentes.

28. Os valores de corte de viabilidade celular para identificar substâncias químicas de teste que causam danos oculares graves (UN GHS Categoria 1) e substâncias químicas de teste que não requerem classificação para irritação ocular ou dano ocular grave (UN GHS Nº Category) são fornecidos a seguir.

Tabela 2: Modelo de previsão do método de teste STE

Viabilidade Celular		**Classificação UN GHS**	**Aplicabilidade**
A 5%	**A 0.05%**		
>70%	>70%	Sem categoria	Substâncias e misturas, com exceção de i) substâncias altamente voláteis com pressão de vapor acima de 6kPa[1] e ii) produtos químicos sólidos (substâncias e misturas) que não sejam surfactantes e misturas compostoas por outros surfactantes
≤ 70%	>70%	Sem previsão	Não se aplica
≤ 70%	≤ 70%	Categoria 1	Substâncias e misturas[2]

[1] As misturas que contêm substâncias com pressão de vapor superior a 6kPa devem ser avaliadas com cuidado para evitar possíveis subestimações e devem ser justificadas caso a caso.

[2] Com base nos resultados obtidos, principalmente com substâncias monoconstituintes, embora também exista quantidade limitada de dados sobre o ensaio de misturas. O método de ensaio é, no entanto, tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multiconstituintes. Antes de usar estaDiretriz de Teste em uma mistura, para gerar dados para uma finalidade regulatória pretendida, deve-se considerar se e por que pode fornecer resultados adequados para essa finalidade. Tais considerações não são necessárias, quando há exigência regulamentar para o teste de uma mistura.

[3] Nenhuma previsão pode ser feita a partir deste resultado isolado. O resultado do teste STE deve ser considerado no contexto de um AITA(3) para fins de classificação.

Critérios de aceitação

29. Os resultados dos testes são considerados aceitáveis quando os seguintes critérios são satisfeitos:

a) A densidade óptica do controle do meio (exposto ao meio de cultura) deve ser de 0,3 ou superior, após a subtração da densidade óptica em branco.

b) A viabilidade do controle do solvente deve ser de 80% ou superior em relação ao controle do meio. Se múltiplos controles de solvente forem usados em cada repetição, cada um desses controles deve mostrar viabilidade celular superior a 80%, para qualificar as substâncias químicas testadas com esses solventes.

c) A viabilidade celular obtida com o controle positivo (SLS 0,01%) deve estar dentro de dois desvios-padrão da média histórica. Os limites superior e inferior de aceitação para o controle positivo devem ser frequentemente atualizados, isto é, de três em três meses, ou sempre que um teste aceitável for realizado em laboratórios, onde os testes são realizados com pouca frequência (menos de uma vez por mês). Quando um laboratório não completar número suficiente de experimentos para estabelecer uma distribuição de controle positiva estatisticamente robusta, é aceitável que os limites superior e inferior de aceitação estabelecidos pelo desenvolvedor do método sejam usados, isto é, entre 21,1% e 62,3%, de acordo com seus dados históricos laboratoriais, enquanto uma distribuição interna é construída durante os primeiros testes de rotina.

   Se algum dos critérios acima – a), b) ou c) – não forem cumpridos, uma repetição adicional deve ser realizada.

d) O desvio-padrão da viabilidade celular final, derivada de três repetições independentes, deve ser inferior a 15%, para as concentrações de 5%, e 0,05% da substância química em estudo. Se o desvio-padrão for maior ou igual a 15%, os resultados não devem ser usados e mais três repetições devem ser realizadas.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

30. Os dados para cada poço individual (por exemplo, valores de viabilidade celular) de cada repetição, bem como média geral, SD e classificação devem ser relatados.

Relatório de teste

31. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

Teste das Substâncias Químicas e de Controle

- Substância monoconstituinte: identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) de registro CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores
- Substância multiconstituinte, UVCB e mistura: caracterização, tanto quanto possível – por exemplo, identidade química (ver acima), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver acima) –, dos constituintes, na medida em que estejam disponíveis
- Estado físico, volatilidade, pH, LogP, peso molecular, classe química e propriedades físico-químicas relevantes adicionais para a realização do estudo, na medida do disponível
- Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado, e praticamente viável, etc.
- Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
- Condições de armazenamento e estabilidade na medida do possível

Condições e Procedimentos do Método de Teste

- Nome e endereço do patrocinador, instalação de teste e diretor de estudo
- Descrição do método de teste utilizado
- Linhagem celular utilizada, sua origem, número de passagem e confluência de células usadas para teste
- Detalhes do procedimento de teste utilizado
- Número de repetições e réplicas usadas
- Teste das concentrações químicas utilizadas (se diferentes das recomendadas)
- Justificativa para a escolha do solvente para cada substância química em estudo
- Duração da exposição à substância química em estudo (se diferente do recomendado)
- Descrição de quaisquer modificações do procedimento de teste

- Descrição dos critérios de avaliação e decisão utilizados
- Referência à média do controle positivo histórico e desvio-padrão (DP)
- Demonstração da proficiência do laboratório na execução do método de teste (por exemplo, teste de substâncias de proficiência) ou demonstração de desempenho reproduzível do método de teste ao longo do tempo

Resultados

- Para cada substância química de teste, de controle e cada concentração testada, deve-se tabular, para os valores DO individuais por poço replicado, os valores das médias aritméticas de DO para cada repetição independente, porcentagem de viabilidade celular para cada repetição independente e média aritmética final das porcentagens de viabilidade celular média e SD ao longo das três repetições
- Resultados para o meio, o solvente e o controle positivo, demonstrando critérios adequados de aceitação do estudo
- Descrição de outros efeitos observados
- A classificação geral derivada com referência ao modelo/decisão de previsão e critérios utilizados

Discussão dos Resultados

Conclusões

LITERATURA

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Scott L, et al. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. Toxicol. In Vitro 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an In Vitro Eye Irritation Test Using SIRC Cells. Toxicol. In Vitro 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. Toxicol. In Vitro 25,796-809.

(6) Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. Toxicol. In Vitro 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/oc-utox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) OECD (2012). Test Guideline for Testing of Chemicals (No.405): Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. J. Pharm. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC. (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (N^{O} 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an In Vitro Assay of Ocular Irritancy. FundamApplToxicol. 18, 442-449.

(13) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N^{O} 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment N^{O} 263.ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ANEXO 1

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de relevância. O termo é frequentemente usado, de forma intercambiável, com concordância para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste[13].

Substância de referência: uma substância usada como padrão para comparação com uma substância química de teste. Uma substância de referência deve ter as seguintes propriedades: (i) uma fonte consistente e confiável; (ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias testadas; (iii) características físicas-químicas conhecidas; (iv) dados de suporte sobre efeitos conhecidos; e (v) potência conhecida no intervalo da resposta desejada.

Abordagem Bottom-Up: uma abordagem passo a passo, usada para um teste químico suspeito de não exigir classificação para irritação ocular ou dano ocular grave, que começa com a determinação de substâncias químicas que não exigem classificação (resultado negativo) de outras substâncias químicas (resultado positivo).

Substância química: significa uma substância ou mistura.

Irritação ocular: produção de alteração no olho após a aplicação de uma substância química em teste na superfície anterior do órgão, que seja totalmente reversível dentro de 21 dias após a aplicação. Intercambiável com "efeitos reversíveis no olho" e com GHS da ONU Categoria 2[1].

Taxa de falso negativo: a proporção de todas as substâncias químicas positivas falsamente identificadas por um método de teste como negativas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Taxa de falso positivo: a proporção de todas as substâncias químicas negativas falsamente identificadas por um método de teste como positivas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Risco: propriedade inerente de um agente ou uma situação que tem o potencial de causar efeitos adversos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto a esse agente.

Meio de Controle: uma réplica não tratada, contendo todos os componentes de um sistema de teste. Esta amostra é processada com amostras tratadas com substâncias químicas de teste e outras amostras de controle, para determinar se o solvente interage com o sistema de teste.

Mistura: uma mistura ou solução composta de duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem entre si[1].

Substância monoconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, na qual um constituinte principal está presente em, pelo menos, 80% (p/p).

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

Substância multiconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que mais de um constituinte principal está presente na concentração $\geq$10% (p/p) e $<$80% (p/p). Uma substância multiconstituinte é o resultado de um processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela mistura de duas ou mais substâncias sem reação química. Uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

DO: densidade óptica.

Controle positivo: um replicado contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Relevância: descrição da relação do teste com o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a medida em que o teste mede ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[10].

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado replicavelmente dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, usando-se o mesmo protocolo. Avalia-se calculando a reprodutibilidade intra e interlaboratorial e a repetibilidade intralaboratorial[13].

Sensibilidade: a proporção de todas as substâncias químicas positivas/ativas que são classificadas corretamente pelo teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[10].

Lesões oculares graves: produção de danos nos tecidos oculares ou grave decaimento físico da visão, após a aplicação de uma substância química teste na superfície anterior do olho, que não seja totalmente reversível dentro de 21 dias da aplicação. É intercambiável com "efeitos oculares irreversíveis" e com o GHS da ONU Categoria 1[1].

Solvente ou veículo de controle: uma amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de teste, incluindo o solvente ou veículo processado com as amostras tratadas com os produtos de teste e outras amostras de controle, para estabelecer a resposta de linha de base para as amostras tratadas dissolvidas naquele solvente ou veículo. Ao testar com um controle de meio concorrente, essa amostra também demonstra se o solvente ou o veículo interage com o sistema de teste.

Especificidade: a proporção de todas as substâncias químicas negativas/inativas que são classificadas corretamente pelo teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos e é uma consideração importante na avaliação da relevância de um método de teste[13].

Substância: elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e quaisquer impurezas derivadas do processo utilizado e excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou alterando sua composição[1].

Surfactante: também chamado de agente tensoativo, é um produto químico, como um detergente, que reduz a tensão superficial de um líquido e, assim, permite que ele espume ou penetre nos sólidos; também é conhecido como agente umectante.

Substância química de teste: é usado para se referir ao que está sendo testado.

Estratégia de teste escalonada: uma estratégia de teste escalonada, na qual todas as informações existentes sobre uma substância química em teste são revisadas, em uma ordem especificada, usando um processo de evidência em cada camada para determinar se há informações suficientes disponíveis para uma decisão de classificação de risco, antes da progressão para o próximo nível. Se o potencial de irritação de uma substância química em teste puder ser definido, com base nas informações existentes, nenhum teste adicional é necessário. Caso contrário, um procedimento de teste sequencial por etapas em animais será realizado até que uma classificação inequívoca possa ser feita.

Abordagem de cima para baixo: abordagem passo a passo usada para um teste químico suspeito de causar dano ocular grave, que começa com a determinação de substâncias químicas que induzem dano ocular grave (resultado positivo) de outras substâncias químicas (resultado negativo).

Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas das Nações Unidas (GHS da ONU): um sistema que propõe a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas), de acordo com tipos e níveis padronizados de riscos físicos, de saúde e ambientais, abordando elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras sinalizadoras, declarações de perigo, declarações de precaução e fichas de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos com vistas a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o ambiente[1].

UN GHS Categoria 1: veja “Lesões oculares graves”.

Categoria GHS da ONU 2: veja “Irritação ocular”.

UN GHS Sem Categoria: substâncias químicas que não são classificadas como UN GHS Categoria 1 ou 2 (2A ou 2B).

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

Adotado: 25 de Junho de 2018

Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 492

Método de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE) reconstruído para identificar substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular grave

INTRODUÇÃO

1. Lesões oculares graves referem-se à produção de danos nos tecidos oculares ou a um grave declínio físico da visão, após a aplicação de uma substância química em teste na superfície anterior do olho, que não seja totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação, conforme definido pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas das Nações Unidas (UN GHS)[(1)]. Ainda de acordo com o GHS, a irritação ocular refere-se à produção de alterações no olho após a aplicação de uma substância química em teste na superfície ocular anterior, que são totalmente reversíveis dentro de 21 dias da aplicação. Substâncias químicas em teste que causam danos oculares graves são classificadas como Categoria 1 do GHS, enquanto aquelas que provocam irritação oculares são classificadas como Categoria 2 do GHS. As substâncias químicas não classificadas como irritantes oculares ou graves são definidas como aquelas que não atendem aos requisitos de classificação, como Categoria 1 ou 2 (2A ou 2B) do GHS, ou seja, elas são referidos como Sem Categoria do GHS.

2. A avaliação de lesões oculares graves/irritação ocular envolve normalmente a utilização de animais de laboratório (OECD Diretriz de Teste (DT) 405; adotada em 1981 e atualizada em 1987, 2002, 2012 e 2017)[(2)]. A escolha do método mais apropriado e a utilização desta Diretriz de Teste devem ser vistos no contexto do Documento de Orientação da OECD sobre Abordagens Integradas de Teste e Avaliação (AITA) para Danos Oculares Graves e Irritação Ocular[(3)].

3. Esta Diretriz de Teste descreve um procedimento *in vitro* que permite a identificação de substâncias químicas (isoladas e misturas) que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou lesões oculares graves, de acordo com o GHS.

Utiliza o epitélio reconstruído em forma de córnea humana (RhCE, do inglês *Reconstructed human Cornea-like Epithelium*), que imita de perto as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do epitélio corneano humano. Quatro outros métodos de testes *in vitro* foram validados, considerados cientificamente válidos e adotados com as Diretrizes de Teste da OECD (DT) 437[4], 438[5], 460[6] e 491[7], para abordar o ponto de vista da saúde humana, os danos oculares graves ou nenhuma classificação.

4. Três métodos de teste validados usando modelos de RhCE disponíveis comercialmente estão incluídos nesta Diretriz de Teste. Estudos de validação para avaliar a irritação/o dano ocular grave foram conduzidos[8-16] usando o Teste de Irritação Ocular do EpiOcular™ (EIT), o EIT SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) e o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT. Cada um desses métodos faz uso de construções de tecido de RhCE disponíveis comercialmente como sistema de teste, dois deles sendo referidos, no texto a seguir, como os Métodos de Referência Validados - EpiOcular™ EIT (VRM1) e SkinEthic™ HCE EIT (VRM2), respectivamente. A partir desses estudos de validação e de sua revisão independente por pares[10;13], concluiu-se que o EpiOcular™ EIT, o SkinEthic™ HCE EIT e o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT são capazes de identificar corretamente substâncias químicas (misturas e substâncias) que não exigem classificação e rotulagem. Para irritação ocular ou lesões oculares graves de acordo com o GHS[1], os métodos de teste foram apontados como cientificamente válidos para esse fim[14]. Os anexos II-V fornecem uma sinopse dos elementos importantes dos métodos de teste, bem como fluxogramas que fornecem orientação para situações específicas.

5. Atualmente, é aceito que, no futuro próximo, nenhum método de teste *in vitro* será capaz de substituir totalmente o teste ocular de Draize *in vivo*[2;16] para prever toda a gama de respostas de irritação/lesões oculares graves para diferentes classes químicas. No entanto, combinações engenhosas de vários métodos alternativos, dentro de estratégias de teste (em camadas), como a abordagem Bottom-Up/Top-Down, podem substituir totalmente o teste ocular de Draize[17]. A abordagem Bottom-Up foi projetada para ser usada quando, com base nas informações existentes, não se espera que uma substância química cause irritação ocular suficiente para exigir uma classificação, enquanto a abordagem Top-Down é projetada para ser usada quando, com base nas informações existentes, espera-se que uma substância química cause sérios danos aos olhos.

Recomenda-se que o EpiOcular™ EIT, o SkinEthic™ HCE EIT e o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT sejam usados para identificar substâncias químicas que não exijam classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves, de acordo com o GHS (Sem Categoria do GHS)[1], sem testes adicionais dentro de uma estratégia de teste, como a abordagem Bottom-Up/Top-Down, sugerida por Scott *et al.*, por exemplo, ou como uma etapa inicial em uma abordagem Bottom-Up ou até como uma das últimas etapas de uma abordagem Top-Down. No entanto, o EpiOcular™ EIT, o SkinEthic™ HCE EIT e o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT não são destinados para diferenciar entre Categoria 1 (dano ocular grave) e Categoria 2 (irritação ocular) do GHS. Essa diferenciação precisará ser tratada por outro nível dentro de uma estratégia de teste[3]. Uma substância química em teste que necessite de classificação para irritação ocular/dano ocular grave com EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT ou LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT exigirá testes adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*) para se chegar a uma conclusão definitiva (Sem Categoria, Categoria 2 ou Categoria 1 do GHS, utilizando, por exemplo, DT 437, 438, 460, 491 ou, se necessário, DT 405).

6. O objetivo desta Diretriz de Teste é descrever o procedimento usado para avaliar o potencial de risco ocular de uma substância química em teste, com base em sua capacidade de induzir citotoxicidade em uma construção de tecido RhCE, conforme medido pelo teste de corante de tetrazólio {TD; por exemplo, brometo de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio; Brometo de tiazolilo azul de tiazolilo; CAS RN 298-93-1] para VRM1 e VRM2, ou WST-8 [2- (2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4- nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) -2H- tetrazólio, sal monossódico; CAS RN 193149-74-5] para LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT}[18-19] (ver parágrafo 22). A viabilidade do tecido RhCE após a exposição a uma substância química em teste é determinada em comparação com os tecidos tratados com a substância de controle negativo (% de viabilidade), sendo utilizada, posteriormente, para prever o potencial risco ocular da substância química em estudo.

7. Os Padrões de Desempenho[20] estão disponíveis para facilitar a validação de métodos de teste *in vitro* baseados em RhCE modificados, semelhantes ao EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT e ao LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, de acordo com os princípios do Documento de Orientação nº 34[21], e para permitir a alteração oportuna desta Diretriz de Teste para sua inclusão. A Aceitação Mútua de Dados (AMD) só será garantida para os métodos de teste validados, de acordo com os Padrões de Desempenho, se esses métodos de teste tiverem sido atualizados e incluídos nesta Diretriz de Teste pela OECD.

8. As definições são fornecidas no anexo I.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

9. Esta Diretriz de Teste é baseada em construções de tecido tridimensional comercial de RhCE, que são produzidos usando-se tanto queratinócitos epidérmicos primários humanos (EpiOcular™ OCL-200), quanto células epiteliais da córnea humana imortalizadas (SkinEthic™ HCE/ S), ou células epiteliais primárias da córnea humana (isto é, LabCyte CORNEA-MODEL24). As estruturas de tecido EpiOcular™ OCL-200, SkinEthic™ HCE/ S e LabCyte CORNEA-MODEL24 RhCE são semelhantes à estrutura tridimensional do epitélio corneano *in vivo* e são produzidas usando-se células da espécie de interesse[22-24]. Além disso, os métodos de teste medem diretamente a citotoxicidade resultante da penetração da substância química através da córnea e a produção de danos nas células e tecidos após a exposição química, o que determina a resposta global de danos oculares graves/resposta irritativa. O dano celular pode ocorrer por vários modos de ação (ver parágrafo 21), mas a citotoxicidade desempenha papel importante, se não primordial, na determinação da resposta geral grave ocular/irritação ocular de uma substância química, manifestada *in vivo* principalmente pela opacidade da córnea, irite, vermelhidão conjuntival e/ou quemose conjuntival, independentemente dos processos físico-químicos subjacentes ao dano tecidular.

10. Uma ampla gama de substâncias químicas, abrangendo uma variedade de tipos químicos, classes químicas, pesos moleculares, LogPs, estruturas químicas, etc., foi testada no estudo de validação subjacente a esta Diretriz de Teste. O banco de dados de validação do EpiOcular™ EIT continha 113 substâncias químicas no total, abrangendo 95 diferentes grupos funcionais orgânicos, de acordo com uma análise da caixa de ferramentas QSAR da OECD[9]. A maioria destes substâncias químicas representava substâncias monoconstituintes, mas várias substâncias multiconstituintes (incluindo 3 homopolímeros, 5 copolímeros e 10 semipolímeros) também foram incluídas no estudo. Em termos de estado físico e categorias GHS, as 113 substâncias químicas testadas foram distribuídas da seguinte forma: 13 líquidos Categoria 1, 15 sólidos Categoria 1, 6 líquidos Categoria 2A, 10 sólidos Categoria 2A, 7 líquidos Categoria 2B, 7 sólidos Categoria 2B, 27 líquidos Sem Categoria e 28 sólidos Sem Categoria[8]. O banco de dados de validação do SkinEthic™ HCE EIT continha 200 substâncias químicas no total,

abrangendo 165 diferentes grupos funcionais orgânicos[9;11-12]. A maioria destes químicos representava substâncias monoconstituintes, mas várias substâncias multiconstituintes (incluindo 10 polímeros) também foram incluídas no estudo.

Em termos de estado físico e Categorias GHS, os 200 substâncias químicas testadas foram distribuídas da seguinte forma: 27 líquidos Categoria 1, 24 sólidos Categoria 1, 19 líquidos Categoria 2A, 10 sólidos Categoria 2A, 9 líquidos Categoria 2B, 8 sólidos Categoria 2B, 50 líquidos Sem Categoria e 53 sólidos Sem Categoria[11-12]. O banco de dados de validação (catch-up) EIT do LabCyte CORNEA-MODEL24 continha 30 substâncias químicas de referência listadas nos padrões de desempenho[20] desta Diretriz de Teste.

11. Esta Diretriz de Teste é aplicável a substâncias e misturas e também a sólidos, líquidos, semissólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não aquosos; os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Sempre que possível, os sólidos devem ser moídos até se tornarem um pó fino antes da aplicação; nenhum outro pré-tratamento da amostra é necessário. Gases e aerossóis não foram avaliados em um estudo de validação. Embora seja concebível que possam ser testados usando-se a tecnologia RhCE, a Diretriz de Teste atual não permite testes de gases e aerossóis.

12. Os substâncias químicas de teste que absorvem luz na mesma faixa do corante formazan (CF ou FD, em inglês, naturalmente ou após o tratamento) e as substâncias químicas de teste capazes de reduzir diretamente o corante vital TD (para CF ou FD) podem interferir nas medições de viabilidade tecidular e precisam do uso de controles adaptados para correções. O tipo de controles adaptados que podem ser necessários vai variar, dependendo do tipo de interferência produzida pela substância química em teste e do procedimento usado para quantificar cada FD (ver parágrafos 37-43).

13. Os resultados gerados nos estudos de pré-validação[25-27] e validação[9;11-12;15] demonstraram que o EpiOcular™ EIT, o SkinEthic™ HCE EIT e o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT são transferíveis para laboratórios considerados ingênuos na condução dos ensaios e também são reprodutíveis dentro e entre os laboratórios. Com base nesses estudos, o nível de reprodutibilidade em termos de concordância de previsões, que podem ser esperadas do EpiOcular™ EIT, a partir de dados

sobre 113 substâncias químicas, é da ordem de 95% dentro de laboratórios e 93% entre laboratórios. O nível de reprodutibilidade em termos de concordância de previsões, que podem ser esperadas do SkinEthic™ HCE EIT, a partir de dados sobre 120 substâncias químicas, é da ordem de 92% dentro de laboratórios e 95% entre laboratórios. O nível de reprodutibilidade em termos de concordância de previsões, que podem ser esperadas do LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, a partir de dados de 30 substâncias químicas de referência listadas nos padrões de desempenho[21], é da ordem de 96% em laboratórios e 87% entre laboratórios.

14. O EpiOcular™ EIT pode ser usado para identificar substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves, de acordo com o GHS[1]. Considerando os dados obtidos no estudo de validação[9], o EpiOcular™ EIT possui acuracidade geral de 80% (com base em 112 substâncias químicas), sensibilidade de 96% (baseada em 57 substâncias químicas), taxa de falso negativo de 4% (baseada em 57 substâncias químicas), especificidade de 63% (com base em 55 substâncias químicas) e taxa de falsos positivos de 37% (com base em 55 substâncias químicas), quando comparados com dados de teste ocular de coelho *in vivo* (OECD DT 405)[2;16], de acordo com o GHS[1]. Um estudo em que 97 formulações agroquímicas líquidas foram testadas com o EpiOcular™ EIT demonstrou desempenho similar do método de teste para este tipo de misturas, conforme obtido no estudo de validação[28]. As 97 formulações estavam distribuídas da seguinte forma: 21 Categoria 1, 19 Categoria 2A, 14 Categoria 2B e 43 Sem Categoria, classificados de acordo com o GHS[1], com base em dados de teste ocular de coelho *in vivo* (OECD DT 405)[2;16]. Precisão geral de 82% (com base em 97 formulações), sensibilidade de 91% (com base em 54 formulações), taxa de falso negativo de 9% (com base em 54 formulações), especificidade de 72% (com base em 43 formulações) e taxa de falso positivo de 28% (com base em 43 formulações) foram obtidas[28].

15. O SkinEthic™ HCE EIT pode ser usado para identificar substâncias químicas para irritação ocular ou lesões oculares graves que não exijam classificação, de acordo com o GHS[1]. Considerando os dados obtidos no estudo de validação[11-12], o SkinEthic™ HCE EIT tem precisão geral de 84% (com base em 200 substâncias químicas), sensibilidade de 95% (com base em 97 substâncias químicas), taxa de falso negativo de 5% (com base em 97 substâncias químicas),

especificidade de 72% (com base em 103 substâncias químicas) e taxa de falso positivo de 28% (com base em 103 substâncias químicas), quando comparado com dados *in vivo* de teste de referência ocular de coelho (OECD DT 405)[2-16], classificados de acordo com o GHS[1].

16. O LabCyte CORNEA-MODEL EIT pode ser usado para identificar substâncias químicas que não exijam classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves, de acordo com o GHS[1]. Considerando os dados obtidos no estudo de recuperação/atualização de validação[15], o EIT LabCyte CORNEA-MODEL atende aos critérios de reprodutibilidade e capacidade reprodutiva, conforme exigido pelos Padrões de Desempenho desta Diretriz[20].

Além disso, um banco de dados composto de 139 substâncias químicas foi testado pelo desenvolvedor de constructo de tecido (dados não publicados).

17. As taxas de falso negativo, obtidas com os métodos de teste de RhCE com substâncias ou misturas, estão dentro da variabilidade *in vivo* do teste ocular de Draize, de 12%[29]. Os índices de falsos positivos obtidos com qualquer método de teste de RhCE, com substâncias ou misturas não, são críticos no contexto desta Diretriz de Teste; todas as substâncias químicas em teste que produzam viabilidade tecidular igual ou menor do que os limites estabelecidos (ver parágrafo 45) demandarão testes adicionais com outro(s) método(s) de teste *in vitro* (ou, como última opção, em coelhos), dependendo dos requisitos regulatórios, de acordo com o Documento de Orientação da OECD sobre Abordagens Integradas de Testes e Avaliação de Dano Ocular Grave e Irritação Ocular[3]. Estes métodos de teste podem ser usados para todos os tipos de substâncias químicas, cujos resultados negativos devem ser aceitos por não classificar uma substância química para irritação ocular e lesões oculares graves (Sem Categoria do GHS). As autoridades regulatórias apropriadas devem ser consultadas antes de se usar o EpiOcular™ EIT, o SkinEthic™ HCE EIT e o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, segundo esquemas de classificação diferentes do GHS.

18. Uma limitação desta Diretriz de Teste é que ela não permite a discriminação entre irritação ocular/efeitos oculares reversíveis (Categoria 2) e lesões oculares graves/efeitos oculares irreversíveis (Categoria 1), nem entre irritantes oculares (Categoria 2ª opcional) e irritantes oculares suaves (Categoria 2B opcional), con-

forme definido pelo GHS[1]. Para esses propósitos, testes adicionais com outros guias de testes *in vitro* são necessários[3].

19. O termo "substância química em teste" é utilizado nesta Diretriz de Teste para se referir ao que está sendo testado[1] e não está relacionado à aplicabilidade do método de teste de RhCE ao teste de substâncias e/ou misturas.

[1] Em junho de 2013, a Reunião Conjunta concordou que, sempre que possível, um uso mais consistente do termo "substância química em teste", descrevendo o que está sendo testado, deve ser aplicado em Diretrizes de Teste novas e atualizadas.

PRINCÍPIO DO TESTE

20. A substância química em estudo é aplicada topicamente a, no mínimo, duas construções tridimensionais de tecido RhCE e a viabilidade do tecido é medida após a exposição e a um período de incubação pós-tratamento. Os tecidos RhCE são reconstruídos a partir de queratinócitos epidérmicos humanos primários, células epiteliais da córnea humana imortalizadas ou de cultura primária de células epiteliais da córnea humana, que foram cultivadas durante vários dias para formar um epitélio escamoso estratificado altamente diferenciado, morfologicamente semelhante ao encontrado na córnea humana. A construção de tecido EpiOcular™ e LabCyte CORNEA-MODEL24 RhCE consiste em, pelo menos, 3 camadas viáveis de células e uma superfície não queratinizada, mostrando uma estrutura semelhante à córnea análoga à encontrada *in vivo*[24]. A construção tecidular SkinEthic™ HCE RhCE consiste em, pelo menos, 4 camadas viáveis de células, incluindo células basais colunares, células alares transicionais e células escamosas superficiais similares às do epitélio corneano humano normal[23;30].

21. Lesões oculares/irritação ocular graves induzidas por substâncias químicas, manifestadas *in vivo*, principalmente por opacidade da córnea, irite, vermelhidão conjuntival e/ou quemose conjuntival, são o resultado de uma cascata de eventos que começam com a penetração da substância química através da córnea e/ou conjuntiva e a produção de danos às células. O dano celular pode ocorrer por vários modos de ação, incluindo: lise da membrana celular (por exemplo, por surfactantes, solventes orgânicos); coagulação de macromoléculas (particularmente proteínas), por exemplo, por surfactantes, solventes orgânicos, álcalis e ácidos;

saponificação de lipídios (por álcalis); e alquilação ou outras interações covalentes com macromoléculas (por branqueadores, peróxidos e alquilantes)[17;31-32]. No entanto, demonstrou-se que a citotoxicidade desempenha papel importante, se não primordial, na determinação da resposta geral grave dos olhos/irritação ocular de uma substância química, independentemente dos processos físico-químicos subjacentes aos danos nos tecidos[33-34]. Contudo, o potencial de dano ocular/irritação ocular severa de uma substância química é determinado principalmente pela extensão da lesão inicial[31], que se correlaciona com a extensão da morte celular[33] e com a extensão das respostas subsequentes e eventuais resultados[36]. Assim, os irritantes leves geralmente afetam apenas o epitélio superficial da córnea, os irritantes leves e moderados danificam principalmente o epitélio e o estroma superficial e os irritantes severos danificam o epitélio, o estroma profundo e, por vezes, o endotélio da córnea[34;37].

A medição da viabilidade da construção de tecido RhCE, após exposição tópica a uma substância química em teste, para identificar substâncias químicas que não requerem classificação para danos oculares graves/irritação ocular (Sem Categoria do GHS), é baseada na suposição de que todas as substâncias químicas que causam danos oculares graves ou irritação nos olhos induzirão citotoxicidade no epitélio e/ou na conjuntiva da córnea.

22. A viabilidade do tecido RhCE é classicamente medida por conversão enzimática de TD (MTT para VRM1 e VRM2 ou WST-8 para LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) pelas células viáveis do tecido em FD colorido (MTT azul de formazan ou WST-8 amarelo de formazan). O MTT azul de FD é quantitativamente medido após a extração dos tecidos[18], enquanto o amarelo de WST-8 FD não requer extração, devido à sua solubilidade em água, sendo medido diretamente a partir da solução WST-8, na qual os tecidos são incubados durante o teste WST-8[19]. As substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem, de acordo com o GHS (Sem Categoria), são identificadas como aquelas que não diminuem a viabilidade tecidular abaixo de um limiar definido (viabilidade tecidular >60% para EpiOcular™ EIT e SkinEthic ™ HCE EITL 2, >50% para SkinEthic™ HCE EITS3 ou >40% para LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) (ver parágrafo 45).

[2] EITL: EIT para líquidos, no caso de SkinEthic™ HCE.
[3] EITS: EIT para sólidos, no caso de SkinEthic™ HCE.

DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA

23. Antes do uso rotineiro dos métodos de teste RhCE para fins regulatórios, os laboratórios devem demonstrar proficiência técnica, prevendo corretamente as quinze substâncias químicas de proficiência listadas na tabela 1. Essas substâncias químicas foram selecionadas a partir de produtos usados nos estudos de validação do VRM1 e do VRM2[11-12].

A seleção inclui, na medida do possível, substâncias químicas que: (i) cobrem diferentes estados físicos; ii) abrangem toda a gama de lesões oculares graves/ resposta à irritação ocular, com base nos resultados de alta qualidade, obtidos no teste ocular de referência em coelho (OECD DT 405)[2;16] e no GHS (ou seja, Categorias 1, 2A, 2B ou Sem Categoria)[1]; (iii) abrangem os vários fatores de classificação *in vivo*[29;38]; (iv) são representativas das classes químicas utilizadas no estudo de validação[9;11-12]; (v) cobrem ampla representação de grupos funcionais orgânicos[9;11-12]; (vi) têm estruturas químicas bem definidas[9;11-12]; (vii) são redutoras coloridas e/ou diretas de TD; (viii) produziram resultados reprodutíveis nos métodos de teste de RhCE, durante suas validações; (ix) foram corretamente previstas pelos métodos de teste de RhCE, durante seus estudos de validação; (x) cobrem toda a gama de respostas *in vitro*, com base em dados de métodos de teste de RhCE de alta qualidade (viabilidade de 0 a 100%); (xi) estão comercialmente disponíveis; e (xii) não estão associadas a custos proibitivos de aquisição e/ou descarte. Em situações em que uma substância química listada não esteja disponível ou não possa ser utilizada por outras razões justificáveis, outra substância química que cumpra os critérios descritos acima, como substâncias químicas utilizadas na validação dos VRM, podem ser utilizadas. Tais mudanças devem, no entanto, ser justificadas.

Tabela 1: Lista de substâncias químicas de proficiência

Nome Químico	CASRN	Grupo Orgânico Funcional[1]	Estado Físico	Viabilidade VRM 1 (%)[2]	Viabilidade VRM 2 (%) [3-1]	Viabilidade LabCyte (%) [3-1]	Previsão VRM	Redutor de TS	Interferência de Cor
Categoria 1 *In vivo*[4]									
Metil Tioglicolato	2365-48-2	Éster de ácido carboxílico; Tioalcool	L	10.9±6.4	5.5±7.4	1.7±1.2	Nenhuma previsão pode ser feita	Sim (forte)	Não
Acrilato de hidroxietilo	818-61-1	Acrilato, álcool	L	7.5±4.755	1.6±1.0	7.5±4.75	Nenhuma previsão pode ser feita	Não	Não

Nome Químico	CASRN	Grupo Orgânico Funcional[1]	Estado Físico	Viabilidade VRM 1 (%)[2]	Viabilidade VRM 2 (%) [3-1]	Viabilidade LabCyte (%) [3-1]	Previsão VRM	Redutor de TS	Interferência de Cor
2,5-Dimetil-2,-5-hexanodiol	110-03-2	Álcool	S	2.3±0.2	0.2±0.1	2.8±2.6	Nenhuma previsão pode ser feita	Não	Não
Oxalato de sódio	62-76-0	Oxocarboxylic acid	S	29.0±1.2	5.3±4.1	3.7±1.5	Nenhuma previsão pode ser feita	Não	Não
Categoria 2A *In vivo*[4]									
2,4,11,13-Tetraazatetradecano-diimidamida, N, N '- bis (4-clorofenil) -3,12-diimino-, di-D-gluconato (20%, aquoso) 6	18472-51-0	Haleto heterocíclico aromático; Halogeneto de arilo; Grupo di-hidroxilo; Guanidina	L	4.0±1.1	1.3±0.6	0.4±0.4	Nenhuma previsão pode ser feita	Não	Sim (fraca)
Benzoato de sódio	532-32-1	Arilo; Ácido carboxílico	S	3.5±2.6	0.6±0.1	2.9±2.6	Nenhuma previsão pode ser feita	Não	Não
Categoria 2B *In vivo*[4]									
Dietil-toluamida	134-62-3	Benzamida	L	15.6±6.3	2.8±0.9	32.4±9.3	Nenhuma previsão pode ser feita	Não	Não
2,2-Dimetil--3-metileno-biciclo [2.2.1] heptano	79-92-5	Alcano, ramificada com carbono terciário; Alceno; Bicicloheptano; Carbociclos com anel em ponte; Cicloalcano	S	4.7±1.5	15.8±1.1	2.2±2.6	Nenhuma previsão pode ser feita	Não	Não
Sem Categoria *In vivo*[4]									
Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazólio	342573-75-5	Alcoxi; Sal de amónio; Arilo; Imidazole; Sulfato	L	79.9±6.4	79.4±6.2	48.0±8.9	Sem Categoria	Não	Não
Éter dipirílico	629-82-3	Alcoxi, Eter	L	97.8±4.3	95.2±3.0	92.7±5.0	Sem Categoria	Não	Não
Butóxido de piperonilo	51-03-6	Alcoxi; Benzodioxole; Benzilo; Éter	L	104.2±4.2	96.5±3.5	95.6±14.0	Sem Categoria	Não	Não
Sem Categoria *In vivo*[4]									
Polietilenoglicol (PEG-40) óleo de rícino hidrogenado	61788-85-0	Acilal; Álcool; Alilo; Éter	Viscoso	77.6±5.4	89.1±2.9	62.6±11.5	Sem Categoria	Não	Não
1- (4-Clorofenil) -3- (3,4-diclorofenil) ureia	101-20=2	Haleto heterocíclico aromático; Halogeneto de arilo; Derivados da ureia	S	106.7±5.3	101.9±6.6	77.8±9.0	Sem Categoria	Não	Não

Nome Químico	CASRN	Grupo Orgânico Funcional[1]	Estado Físico	Viabilidade VRM 1 (%)[2]	Viabilidade VRM 2 (%) [3-1]	Viabilidade LabCyte (%) [3-1]	Previsão VRM	Redutor de TS	Interferência de Cor
2,2'-Metileno-bis- (6-(2H-benzotriazol-2-il) -4- (1,1,3,3-tetrametilbutil) - fenol)	103597-45-1	Alcano ramificado com carbono quaternário; Aromático carbocíclico fundido; Heterociclos saturados fundidos; Compostos quinoides precursores; tert-butilo	S	102.7±13.4	97.7±5.6	90.2±5.8	Sem Categoria	Não	Não
Tetrafluoroborato de potássio	14075-53-7	Sal inorgânico	S	88.6±3.3	92.9±5.1	66.6±0.2	Sem Categoria	Não	Não

Abreviaturas: CASRN = Número de registro do Chemical Abstracts Service; UN GHS = Sistema Global das Nações Unidas de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas(1); VRM1 = Método de Referência Validado, EpiOcular™ EIT; VRM2 = Método de Referência Validado, SkinEthic™ HCE EIT; Interferência de cores com a medição padrão de absorbância (densidade óptica – DO) de FD.

[1] Grupo funcional orgânico designado de acordo com uma análise aninhada do OECD Toolbox 3.1(9).

[2] Com base nos resultados obtidos com o EpiOcular™ EIT no Estudo de Validação da Irritação Ocular EURV ECVAM / Cosmetics Europe (EIVS)(9).

[3] Com base nos resultados obtidos com o SkinEthic™ HCE EIT no estudo de validação(11-12).

[3-1] Com base nos resultados obtidos com o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT no estudo de validação(15).

[4] Com base nos resultados do teste ocular em coelho *in vivo* (OECD DT 405)(2;15) e utilizando o GHS(1).

[5] Com base nos resultados obtidos no Consórcio CEFIC para o estudo da estratégia de teste de irritação ocular in vitro (CON4EI).

[6] A classificação como 2A ou 2B depende da interpretação do critério do GHS para distinguir entre essas duas categorias, ou seja, 1 de 3 vs 2 de 3 animais com efeitos no dia 7 são necessários para gerar uma classificação de Categoria 2A. O estudo *in vivo* incluiu 3 animais. Todos os pontos de término (*end points*), excetuando a opacidade da córnea de um animal, retornaram à pontuação de zero, no dia 7, ou antes disso. O único animal que não se recuperou totalmente no dia 7 teve pontuação de opacidade corneana de 1 (no dia 7) e se recuperou totalmente no dia 9.

24. Como parte dos testes de proficiência, recomenda-se que os usuários verifiquem as propriedades de barreira dos tecidos após o tratamento, conforme especificado pelo produtor de construção de tecido RhCE (ver parágrafos 26, 28 e 31). Isso é particularmente importante se os tecidos precisarem de longo tempo de deslocamento ou se vierem de grandes distâncias. Uma vez que um método de teste tenha sido estabelecido com sucesso e a proficiência em seu uso tenha

sido adquirida e demonstrada, tal verificação não será necessária rotineiramente. No entanto, ao se usar um método de teste com frequência, recomenda-se continuar a avaliar as propriedades de barreira em intervalos regulares.

PROCEDIMENTO

25. Os métodos de teste atualmente cobertos por esta Diretriz de Teste são o EpiOcular™ EIT, o SkinEthic™ HCE EIT e o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT[10;13-14], considerados cientificamente válidos, sendo os dois primeiros referidos como Métodos de Referência Validados (VRM1 e VRM2, respectivamente). Os Procedimentos Operacionais Padrão (POP, Standard Operating Procedures – SOP em inglês) para os métodos de teste de RhCE estão disponíveis e devem ser empregados na implementação e no uso dos métodos de teste em um laboratório[39-41]. Os parágrafos seguintes e o anexo II descrevem os principais componentes e procedimentos dos métodos de teste de RhCE.

COMPONENTES DO MÉTODO DE TESTE RhCE

CONDIÇÕES GERAIS

26. Células relevantes derivadas de humanos devem ser usadas para reconstruir o tecido tridimensional do epitélio semelhante à córnea, que deve ser composto de células progressivamente estratificadas, mas não cornificadas. A construção do tecido RhCE é preparada em inserções com uma membrana sintética porosa, através da qual os nutrientes podem passar para as células. Múltiplas camadas de células epiteliais não queratinizadas viáveis devem estar presentes no epitélio, reconstruído em forma de córnea. A construção de tecido RhCE deve ter a superfície epitelial em contato direto com o ar, de modo a permitir a exposição tópica direta de substâncias químicas em teste de maneira similar à forma como o epitélio da córnea seria exposto *in vivo*. A construção de tecido RhCE deve formar uma barreira funcional com robustez suficiente para resistir à rápida penetração de substâncias de referência citotóxica, por exemplo, Triton X-100 ou dodecil--sulfato de sódio (SDS). A função de barreira deve ser demonstrada e pode ser avaliada – ou pela determinação do tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade tecidular em 50% (ET_{50}), mediante a aplicação de uma substância de referência, na concentração fixa especificada (por exemplo, 100 μL de Triton X-100a 0,3% (v/v), ou pela concentração na qual uma substância de referência

reduz a viabilidade dos tecidos em 50% (IC_{50}), após um tempo de exposição fixo (por exemplo, 30 minutos de tratamento com 50μL de SDS ou 60 minutos de tratamento com 25μL SDS) (ver parágrafo 31). As propriedades de contenção da estrutura de tecido RhCE devem impedir a passagem da substância química em teste em torno da borda do tecido viável, o que poderia levar à má modelagem da exposição corneana.

As células humanas derivadas usadas para estabelecer a construção de tecido RhCE devem estar livres de contaminação por bactérias, vírus, micoplasma e fungos. A esterilidade da construção de tecido deve ser verificada pelo fornecedor quanto à ausência de contaminação por fungos e bactérias.

CONDIÇÕES FUNCIONAIS

Viabilidade

27. O ensaio utilizado para quantificar a viabilidade tecidular é o ensaio TD (MTT para VRM1 e VRM2 ou WST-8 para LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT)[18-20]. Células viáveis de construção de tecido RhCE reduzem o corante vital MTT, formando um precipitado de MTT azul de formazan, que depois é extraído do tecido, utilizando-se isopropanol (ou um solvente semelhante). Alternativamente, as células viáveis de construção de tecido RhCE reduzem o corante vital WST-8 a um amarelo de formazan solúvel em água. O FD extraído pode ser quantificado, usando uma medição padrão de absorbância DO ou um procedimento de espectrofotometria por HPLC/UPLC[42]. A DO da solução em branco isolada (que é o solvente de extração para o ensaio de MTT ou o meio diluído de WST-8 para este teste) deve ser suficientemente pequena, ou seja, DO$<$0,1. Os usuários da construção de tecido RhCE devem garantir que cada lote, da construção de tecido usado, atenda aos critérios definidos para o controle negativo. As faixas de aceitabilidade para os valores de DO de controle negativo para os VRM são fornecidas na tabela 2. Um usuário de espectrofotometria por HPLC/UPLC deve usar as faixas de DO de controle negativo, fornecidas na tabela 2, como critério de aceitação para o controle negativo. Deve ser documentado no relatório de ensaio que os tecidos tratados com a substância de controle negativo são estáveis em cultura (fornecem medições de viabilidade tecidular semelhantes), durante o período de exposição a testes. Um procedimento similar deve ser seguido pelo produtor de tecido como parte do controle de qualidade da liberação do lote. Neste caso,

podem ser aplicados critérios de aceitação diferentes daqueles especificados na tabela 2. Uma faixa de aceitabilidade (limites superior e inferior) para os valores de DO de controle negativo (nas condições do método de teste de CQ) deve ser estabelecida pelo fabricante/fornecedor da construção de tecido RhCE.

Tabela 2: Intervalos de aceitabilidade para valores de DO de controle negativo (para os usuários do método de teste)

Método de Teste	Limite inferior de aceitação	Limite superior de aceitação
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (para protocolos de sólidos e líquidos)	> 0.81	< 2.5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (para protocolos de sólidos e líquidos)	> 1.0	≤ 2.5
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT(para protocolos de sólidos e líquidos)	≥ 0.5	≤ 1.6

[1] Este limite de aceitação considera a possibilidade de um período de expedição/armazenamento prolongado (por exemplo, > 4 dias), o qual demonstrou não afetar o desempenho do método de teste[43].

Função de barreira

28. A construção de tecido de RhCE deve ser suficientemente espessa e robusta para resistir à rápida penetração de substâncias de referência citotóxica, conforme estimado, por ET_{50} (Triton X-100) ou por IC_{50} (SDS) (tabela 3). A função de barreira de cada lote, da construção de tecido de RhCE utilizada, deve ser demonstrada pelo fabricante/fornecedor de construção de tecido, quando fornecer os tecidos ao utilizador final (ver parágrafo 31).

Morfologia

29. O exame histológico da construção de tecido RhCE deve demonstrar a estrutura do epitélio em forma de córnea humana (incluindo pelo menos 3 camadas de células epiteliais viáveis e uma superfície não queratinizada). Para os três métodos de teste, a morfologia apropriada foi estabelecida pelo fabricante/fornecedor e, portanto, não precisa ser demonstrada novamente por um usuário do método de teste para cada lote de tecido usado.

Reprodutibilidade

30. Os resultados dos controles positivos e negativos do método de teste devem demonstrar a reprodutibilidade ao longo do tempo.

Controle de qualidade (CQ)

31. A construção do tecido RhCE deve ser usada somente se o fabricante/fornecedor demonstrar que cada lote construído atende aos critérios de liberação de produção definidos, entre os quais, a viabilidade (parágrafo 27) e a função de barreira são os mais relevantes (ver parágrafo 28). Uma faixa de aceitabilidade (limites superior e inferior) para as funções de barreira medidas por ET_{50} ou IC_{50} deve ser estabelecida pelo fabricante/fornecedor da construção de tecido RhCE (ver parágrafos 26 e 28). A faixa de aceitabilidade ET_{50} e IC_{50}, usada como critério de liberação do Controle de Qualidade do lote pelo fabricante/fornecedor das construções de tecido RhCE e nos métodos de teste, é fornecida na tabela 3. Os dados que demonstram conformidade com todos os critérios de liberação de produção devem ser fornecidos pelo fabricante/fornecedor de tecido RhCE para os usuários do método de teste, para que eles possam incluir essas informações no relatório de teste. Somente os resultados produzidos com tecidos que cumpram todos esses critérios de liberação de produção podem ser aceitos para se prever com segurança quais substâncias químicas não requerem classificação e rotulagem para irritação ocular ou lesões oculares graves, de acordo com o GHS.

Tabela 3: Critérios de liberação do lote do CQ

Método de Teste	Limite inferior de aceitação	Limite superior de aceitação
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 μL de Triton X-100 a 0.3% (v/v))	ET_{50} = 12.2 minutos	ET_{50} = 37.5 minutos
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minutos de tratamento com 50 μL SDS)	IC_{50} = 1.0 mg/mL	IC_{50} = 3.2 mg/mL
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minutos detratamento com 50 μL SDS)	IC_{50} = 1.0 mg/mL	IC_{50} = 4.0 mg/mL

Aplicação das Substâncias Químicas em Teste e das Substâncias de Controle

32. Devem ser utilizadas, pelo menos, duas réplicas de tecido para cada substância química em teste e cada substância de controle para cada ensaio. Dois protocolos de tratamento diferentes são usados: um para substâncias químicas

de teste líquidas e outro para substâncias químicas de teste sólidas[39-41]. Para os dois VRM, a superfície de construção de tecido deve ser umedecida com cálcio e solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco sem magnésio (sem DPBS Ca^{2+}/ Mg^{2+}) antes da aplicação de substâncias químicas em teste, para imitar as condições úmidas do olho humano. O tratamento dos tecidos é iniciado com exposição ao(s) produto(s) químico(s) e substâncias de controle.

Para quaisquer protocolos de tratamento, em qualquer um dos dois VRM, uma quantidade suficiente de substâncias químicas ou de controle deve ser aplicada para cobrir uniformemente a superfície epitelial, evitando uma dose infinita/excessiva (ver parágrafos 33 e 34) (anexo II).

33. Substâncias químicas que podem ser pipetadas a 37°C ou temperaturas mais baixas (usando uma pipeta de deslocamento positivo, se necessário) são tratadas como líquidos nos três métodos de teste; caso contrário, eles devem ser tratados como sólidos (ver parágrafo 34). Nos métodos de ensaio, os substâncias químicas líquidas são distribuídas uniformemente pela superfície do tecido (um mínimo de 60μL/cm^2) (ver anexo II[30-41]). Efeitos capilares (efeitos da tensão superficial), que podem ocorrer devido aos baixos volumes aplicados à inserção (na superfície do tecido), devem ser evitados, na medida do possível, para garantir a dosagem correta do tecido. Os tecidos tratados com substâncias químicas de teste líquidas são incubados por 1 minuto (LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) ou 30 minutos (VRM1 e VRM2) nas condições padrão de cada método. Ao final do período de exposição, a substância química líquida e as substâncias de controle devem ser cuidadosamente removidas da superfície do tecido, por lavagem extensiva com DPBS isento de Ca^{2+} Mg^{2+} à temperatura ambiente. Para os dois VRM, este passo de enxágue deve ser seguido por uma imersão pós-exposição em meio fresco à temperatura ambiente (para remover qualquer produto químico de teste absorvido no tecido), por período de tempo pré-definido, que varia dependendo do VRM utilizado. No VMR1 para LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, uma incubação pós-exposição em meio fresco em condições de cultura padrão é aplicada antes de se realizar o ensaio TD (ver anexo II[39-41]).

34. Os substâncias químicas de teste que não puderem ser pipetadas à temperatura de até 37°C são tratadas como sólidos nos três métodos de teste. A quantidade de produto químico em teste aplicada deve ser suficiente para cobrir toda a superfície do tecido, isto é, deve ser utilizada uma aplicação mínima de

33mg/cm^2 (anexo II). Sempre que possível, os sólidos devem ser testados como um pó fino. Os tecidos tratados com substâncias químicas de teste sólidos são incubados durante período de tempo predefinido (dependendo do método utilizado), em condições de cultura padrão (ver anexo II[39-41]). No final do período de exposição, a substância química em estado sólido e as substâncias de controle devem ser cuidadosamente removidas da superfície do tecido, por lavagem extensiva com DPBS isento de Ca^{2+}/ Mg^{2+} à temperatura ambiente.

Para os dois VRM, este passo de enxágue deve ser seguido por uma imersão pós-exposição em meio fresco, à temperatura ambiente (para remover qualquer substância química de teste absorvida no tecido), por período de tempo predefinido, que varia dependendo do VRM utilizado, seguido de uma incubação pós-exposição em meio fresco em condições de cultura padrão, antes da realização do ensaio TD (ver anexo II[39-42]).

35. Controles negativos e positivos simultâneos devem ser incluídos em cada execução, para demonstrar que a viabilidade (determinada com o controle negativo) e a sensibilidade (determinada com o controle positivo) dos tecidos estão dentro das faixas de aceitação, definidas com base em dados históricos. O controle negativo concorrente também fornece a linha de base (100% de viabilidade tecidular) para calcular a percentagem de viabilidade dos tecidos tratados com a substância química em teste (% $Viabilidade_{teste}$). A substância de controle positivo recomendada para ser utilizada com os VRM é o acetato de metilo puro (CAS RN. 79-20-9, comercialmente disponível a partir de, por exemplo, Sigma-Aldrich, Cat # 45997; líquido) para ambos os protocolos – líquidos e sólidos. As substâncias de controle positivo recomendadas para serem usadas com o LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT são etanol (CAS RN. 64-17-5), para protocolo de líquidos, e ácido láurico (CAS RN 143-07-7), para protocolo de sólidos. As substâncias de controle negativo recomendadas para utilização com o VRM1 e o VRM2 são o H2BS ultrapuro e o DPBS isento de Ca^{2+}/ Mg^{2+}, para os protocolos líquidos e sólidos, respectivamente. O controle negativo recomendado para ser usado é o EIC LabCyte CORNEA-MODEL24 sem Ca^{2+}/ Mg^{2+} DPBS (CAS RN. 64-17-5), para protocolo de líquidos e nenhum tratamento para protocolo de sólidos. Estas foram as substâncias de controle utilizadas nos estudos de validação dos VRM e são aquelas para as quais existem a maioria dos dados históricos. A utilização de substâncias alternativas adequadas, positivas ou negativas, deve ser científica e adequadamente justificada. Controles positivos e negativos devem ser testa-

dos com o(s) mesmo(s) protocolo(s) usado(s) para os substâncias químicas em teste, incluídos na execução (ou seja, para líquidos e/ou sólidos). Esta aplicação deve ser seguida da exposição ao tratamento, enxágue, imersão pós-exposição e incubação pós-exposição, quando aplicável, conforme descrito para os controles efetuados em simultâneo com substâncias químicas de teste líquidos (ver parágrafo 33) ou para controles executados concomitantemente com substâncias químicas de teste sólidos (ver parágrafo 34), antes de realizar o ensaio TD (ver parágrafo 36)[39-41]. Um único conjunto de controles negativos e positivos é suficiente para todas as substâncias químicas de teste, do mesmo estado físico (líquidos ou sólidos), incluídos na mesma execução.

Medidas de Viabilidade Tecidular

36. O ensaio TD é um método quantitativo padronizado[18-19] que deve ser usado para medir a viabilidade tecidular sob esta Diretriz de Teste. É compatível com o uso em uma construção de tecido tridimensional. O ensaio TD é realizado imediatamente após os procedimentos pós-exposição. Os VRM usam o teste MTT. Nos VRM, a amostra de construída de tecido RhCE é colocada em 0,3mL de solução de MTT a 1mg/ mL por 180 ± 15 minutos em condições de cultura padrão. O corante vital MTT é reduzido a um precipitado de MTT azul de formazan pelas células viáveis da construção de tecido RhCE. O precipitado de MTT azul de formazan produzido é extraído do tecido usando um volume adequado de isopropanol (ou um solvente semelhante)[39-40]. Os tecidos testados com substâncias químicas líquidas devem ser extraídos da parte superior e inferior dos mesmos, enquanto os tecidos testados com substâncias químicas sólidas e líquidas coloridas devem ser extraídos somente da parte inferior do tecido (para minimizar qualquer potencial contaminação da solução de extração de isopropanol, por qualquer produto químico que possa ter permanecido no tecido). Os tecidos testados com substâncias químicas líquidas, que não sejam facilmente lavados, também podem ser extraídos apenas da parte inferior do tecido. O método LabCyte CORNEA--MODEL24 EIT usa o teste WST-8. No método LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, a amostra construída do tecido RhCE é colocada em 0,3 mL de solução WST-8 diluída, preparada de acordo com os procedimentos operacionais padrão[41], por 240 minutos, em condições de cultura padrão. O corante vital WST-8 é reduzido a WST-8 amarelo de formazan, pelas células viáveis do tecido RhCE construído, que, por sua vez, foi dissolvido na solução diluída de WST-8[41]. As substâncias de controle positivas e negativas, testadas concomitantemente, devem ser tratadas de forma semelhante à substância química testada. Nos VRM1 e VRM2, o

MTT formazan extraído pode ser quantificado por uma medição de absorbância padrão (DO) a 570nm, usando um filtro de banda de passagem de máximo ± 30nm ou usando um procedimento de espectrofotometria por HPLC/UPLC (ver parágrafo 43)[12;42]. Na EIT LabCyte CORNEA-MODEL24, o WST-8 formazan pode ser quantificado diretamente (isto é, sem a necessidade de um procedimento de extração) por uma medição de absorbância padrão (DO) a 450nm, usando um filtro de passagem de banda máxima de ± 30nm ou utilizando um procedimento de espectrometria por HPLC/UPLC (ver parágrafo 43).

37. As propriedades ópticas da substância química em estudo ou sua ação química em TD (MTT para VRM1 e VRM2, ou WST-8 para LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) podem interferir com a medição de FD, levando a uma falsa estimativa de viabilidade tecidular.

As substâncias químicas em teste podem interferir na medição de FD pela redução direta do TD em FD colorido (MTT azul de formazan ou WST-8 amarelo de formazan) e/ou por interferência de cor, se a substância química de teste absorver, naturalmente ou devido a procedimentos de tratamento, mesma faixa de DO que FD (isto é, MTT formazan: em torno de 570nm; WST-8 formazan: em torno de 450nm). Pré-verificações devem ser realizadas antes do teste para permitir a identificação de potenciais redutores de TD diretos e/ou substâncias químicas interferentes coloridas e controles adicionais devem ser usados para detectar e corrigir potenciais interferências dessas substâncias químicas testadas (ver parágrafos 38-42). Isto é especialmente importante quando uma substância química em teste específica não é completamente removida do tecido de RhCE construído, por enxágue ou quando penetra no epitélio semelhante à córnea e está, portanto, presente nos constructos de tecido de RhCE, quando o ensaio de TD é realizado. Para substâncias químicas de teste que absorvem luz na mesma gama que FD (naturalmente ou após o tratamento), não compatíveis com a medição de absorbância padrão (DO) de FD, devido à forte interferência, ou seja, forte absorção a 570 ± 30nm) ou 450 ± 30nm (com WST-8 formazan), pode ser utilizado um procedimento de espectrofotometria por HPLC/UPLC para medir FD (ver parágrafos 42 e 43)[11;40]. Uma descrição detalhada de como detectar e corrigir a redução direta de TD e as interferências de agentes corantes está disponível nos respectivos POP dos métodos de teste[39-41]. Fluxogramas ilustrativos que fornecem orientação sobre como identificar e manusear redutores de TD diretos e/ou substâncias químicas interferentes de cor para VRM1, VRM2 e LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT também são fornecidos nos anexos III, IV e V, respectivamente.

38. Para identificar a potencial interferência de substâncias químicas em teste que absorvam luz na mesma faixa de FD (naturalmente ou após o tratamento) e decidir sobre a necessidade de controles adicionais, a substância química em teste é adicionada à água e/ou ao isopropanol e incubada por um tempo apropriado, em temperatura ambiente (ver o anexo II, parágrafo 39[40-41]). Se a substância química em estudo, em água e/ou isopropanol, absorver luz suficiente, no intervalo de 570 ± 20nm para VRM1 (ver anexo III), ou se uma solução colorida é obtida ao misturar a substância química em teste com água para VRM2 (ver anexo IV), com LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT (ver anexo V), presume-se que a substância química em teste interfere com a medição de absorbância (DO) padrão de FD. Assim, outros controles colorantes devem ser efetuados ou, alternativamente, deve ser utilizado um procedimento de espectrometria por HPLC/UPLC – caso em que estes controles não são necessários (ver parágrafos 42 e 43 e anexos III, IV e V)[39-41].

Ao se realizar a medição de absorbância padrão (DO), cada produto químico interveniente deve ser aplicado em, pelo menos, duas réplicas de tecido viáveis, que passarão por todo o procedimento de teste; contudo, são incubados com solução de meio, ao invés de TD, durante o passo de incubação TD, para gerar uma cor não específica em tecidos vivos (NSC_{living})[40-41]. O controle NSC_{living} precisa ser realizado, simultaneamente, ao teste da substância química colorida e, no caso de testes múltiplos, um controle independente NSC_{living} precisa ser realizado em cada teste (em cada execução), devido à variabilidade biológica inerente aos tecidos vivos. A viabilidade tecidular real é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidular obtida com tecidos vivos expostos à substância química interferente e incubados com a solução MTT ou WST-8 (% $Viabilidade_{teste}$), menos a porcentagem de cor não específica, obtida com tecidos vivos expostos às substâncias químicas intervenientes e incubados com meio sem MTT ou WST-8, executado, concomitantemente, ao teste que está sendo corrigido (% NSC_{living}), ou seja, viabilidade tecidular verdadeira = (% $Viabilidade_{teste}$) – (% NSC_{living}).

39. Para identificar os redutores diretos de MTT ou WST-8, cada produto químico de teste deve ser adicionado ao TD recém-preparado. Uma quantidade apropriada de produto químico de teste é adicionada a uma solução de TD, sendo a mistura incubada por, aproximadamente, 3 ou 4 horas, em condições de cultura padrão (ver anexos III, IV e V)[39-41]. Se a mistura TD contendo a substância química em teste (ou suspensão para substâncias químicas de teste insolúveis) ficar

azul/roxa (para solução MTT) ou amarela/laranja (para solução WST), presume-se que a substância química reduza diretamente o TD e uma verificação funcional adicional em constructos de tecido de RhCE não viáveis devem ser realizada, independentemente do uso da medição de absorbância padrão (DO) ou de um procedimento de espectrofotometria por HPLC/UPLC. Esta verificação funcional adicional emprega tecidos mortos que possuem apenas atividade metabólica residual, mas absorvem e retêm a substância química em teste de maneira similar aos tecidos viáveis. Os tecidos mortos de VRM1 são preparados por exposição à baixa temperatura ("morto por congelamento"). Os tecidos mortos de VRM2 são preparados por incubação prolongada (pelo menos 24 ± 1 hora) em água, seguida de armazenamento à baixa temperatura ("morte por água"). Os tecidos mortos do LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT são preparados congelando-se os tecidos a -80°C ou abaixo, por 30 minutos, repetindo duas vezes ("mortos pelo congelamento"). Cada produto químico redutor TD é aplicado em, pelo menos, duas réplicas de tecidos mortos, que passam por todo o procedimento de teste, para gerar um controle de redução TD não específica (NSMTT ou NSWST)[39-41]. Um único controle NSMTT ou NSWST é suficiente por produto químico, independentemente do número de testes/execuções realizados.

A viabilidade tecidular verdadeira é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidular obtida com tecidos vivos expostos ao redutor TD (% Viabilidade $_{teste}$), menos a porcentagem de redução TD não específica obtida com os tecidos mortos expostos ao mesmo redutor, calculada em relação à execução de controle negativo concorrentemente ao teste a ser corrigido (% NSMTT ou % NSWST), ou seja, verdadeira viabilidade tecidular = (% Viabilidade$_{teste}$) – (% NSMTT ou % NSWST).

40. As substâncias químicas de teste, identificadas por produzir interferência de cor (ver parágrafo 38) e redução direta de TD (ver parágrafo 39), também exigirão um terceiro conjunto de controles, ao se realizar a medição de absorbância padrão (DO), além de NSMTT ou NSWST e controles NSC$_{living}$ – descritos nos parágrafos anteriores. Este é geralmente o caso de substâncias químicas de cor escura absorvendo luz na faixa de 570 ± 30nm para MTT formazan (por exemplo, azul, roxo, preto) ou com substâncias químicas em teste levemente coloridos, absorvendo luz na faixa de 450 ± 30nm para WST-8 formazan (por exemplo, amarelo, laranja), dado que sua cor intrínseca impede a avaliação de sua capacidade de reduzir diretamente MTT ou WST-8, conforme descrito no parágrafo 39. Isso

força o uso dos controles NSMTT ou NSWST, por padrão, junto com os controles NSC_{living}. As substâncias químicas de teste, para os quais NSMTT ou NSWST e os controles NSC_{living} são realizados, podem ser absorvidas e retidas por tecidos vivos e mortos. Portanto, neste caso, o controle NSMTT ou NSWST pode não apenas corrigir a potencial redução direta de TD pela substância química em teste, mas, também, a interferência de cor decorrente da absorção e retenção da substância química por tecidos mortos. Isso pode levar à dupla correção de interferência de cor, uma vez que o controle NSC_{living} já corrige a interferência de cor decorrente da absorção e da retenção da substância química em teste, pelos tecidos vivos. Para evitar a possível dupla correção para a interferência de cores, um terceiro controle para cores não específicas em tecidos mortos (NSC_{killed}) precisa ser realizado (ver anexos III e IV)[39-41]. Neste controle adicional, a substância química é aplicada em, pelo menos, duas réplicas de tecido mortos, que são submetidos a todo o procedimento de teste, mas são incubados com solução de meio, em vez de TD, durante a etapa de incubação DT. Um único controle NSC_{killed} é suficiente por produto químico, independentemente do número de testes/execuções desenvolvidos isoladamente, mas deve ser realizado simultaneamente ao NSMTT ou NSWST e com o mesmo lote de tecido.

A viabilidade tecidular real é calculada como a porcentagem de viabilidade tecidular obtida com tecidos vivos expostos ao teste químico (% $Viabilidade_{teste}$), menos % NSMTT ou % NSWST, menos % NSC_{living}, mais a porcentagem de cor não específica obtida com tecidos mortos expostos à substância química interferente e incubado com meio sem TD, calculado em relação ao controle negativo executado concorrentemente ao teste que está sendo corrigido (% NSC_{killed}), ou seja, viabilidade real de tecido = [[% $Viabilidade_{teste}$]] - [% NSMTT ou % NSWST] - [% NSC_{living}] + [% NSC_{killed}].

41. É importante observar que a redução não específica da DT e as interferências de cor não específicas podem aumentar a DO (ao se realizarem medições padrão de absorbância) da amostra acima da faixa de linearidade do espectrofotômetro. Também vale destacar que a redução não específica da DT pode aumentar a área do pico FD da amostra (quando se realizam medições por espectrofotometria por HPLC/UPLC) acima do intervalo de linearidade do espectrofotômetro. Nesta base, ao usar RhCE, é importante para cada laboratório determinar a faixa de linearidade da área de OD/pico de seu espectrofotômetro com MTT formazan (CAS RN # 57360-69-7) que está disponível comercialmente em Sigma-Aldrich,

por exemplo (Cat #M2003), ou WST-8 formazan (CAS RN193149-76-7), comercialmente disponível em Dojindo Molecular Technologies.

42. A medição da absorbância padrão (DO) usando um espectrofotômetro é apropriada para avaliar redutores diretos de TD e substâncias químicas de interferência de cor, quando a interferência observada com a medição de FD não é forte (isto é, as DO das amostras obtidas com a substância química, sem qualquer correção para redução direta de TD e/ou interferência de cor, estão dentro da faixa linear do espectrofotômetro). No entanto, os resultados, para os substâncias químicas que produzem % NSMTT ou % NSWST e % NSC_{living} ≥60% (VRM1 e VRM2 para protocolo de líquidos) ou 50% (VRM2 para o protocolo de sólidos) ou 40% (Labcyte CÓRNEA-MODEL24 EIT) do controle negativo, devem ser lidos com cuidado, pois são o ponto de referência estabelecido usado nos VRM para distinguir substâncias químicas classificadas como sem classificação (ver parágrafo 45). A absorbância padrão (DO) não pode, contudo, ser medida quando a interferência com a medição de FD é forte (considerando as DO não corrigidas das amostras de teste que estão fora da faixa linear do espectrofotômetro). Substâncias químicas de teste coloridas ou as substâncias químicas testadas que ficam coloridas em contato com água ou isopropanol, e que interferem fortemente com a medição de absorbância padrão (DO) da FD, ainda podem ser avaliadas usando-se espectrofotometria por HPLC/UPLC (ver anexos III, IV e V).

Isso ocorre porque o sistema HPLC/UPLC permite a separação do FD da substância química antes de sua quantificação[40]. Por esse motivo, os controles NSC_{living} ou NSC_{killed} nunca são necessários ao se usar a espectrofotometria por HPLC/UPLC, independentemente da substância química a ser testada. Os controles NSMTT ou NSWST devem, no entanto, ser utilizados ao se suspeitar que a substância química em estudo reduza diretamente a TD (seguindo o procedimento descrito no parágrafo 39). Os controles NSMTT ou NSWST também devem ser usados com substâncias químicas de teste com uma cor (intrínseca ou aparecendo quando na água) que impede a avaliação de sua capacidade de reduzir diretamente a TD, conforme descrito no parágrafo 39. Ao usar espectrofotometria por HPLC/UPLC para medir FD, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como a área de pico percentual de FD obtida com tecidos vivos expostos à substância química em teste, relativamente ao pico de FD obtido com o controle negativo concorrente. Para substâncias químicas capazes de reduzir diretamente

a TD, a viabilidade tecidular verdadeira é calculada como % Viabilidade$_{teste}$, menos % NSMTT ou, % NSWST – conforme descrito na última frase do parágrafo 39. Por fim, nota-se que os redutores de TD diretos também interferem na cor, que ficam retidos nos tecidos após tratamento, podem reduzir fortemente o TD. Essa redução pode ser tão intensa que leva a DOs (medição padrão de DO) ou a áreas de pico (usando espectrofotometria por HPLC/ UPLC) das amostras testadas que estão fora da faixa de linearidade do espectrofotômetro, impedindo que estas possam ser avaliadas pelo método RhCE, embora estes casos sejam raros.

43. A espectrofotometria por HPLC/UPLC pode ser utilizada com todos os tipos de substâncias químicas em teste para medição de FD (coloridos, não coloridos, redutores de TD e não redutores de TD)[12;42]. Devido à diversidade de sistemas de espectrofotometria por HPLC/UPLC, não é viável para cada usuário estabelecer exatamente as mesmas condições do sistema. Portanto, a qualificação do sistema de espectrofotometria por HPLC/UPLC deve ser demonstrada antes de seu uso para quantificar a TD de amostras, atendendo aos critérios de aceitação de um conjunto de parâmetros de qualificação padrão, baseados naqueles descritos na orientação da Food and Drug Administration (FDA) para indústria em validação do método bioanalítico[42;44]. Estes parâmetros-chave e seus critérios de aceitação são mostrados no anexo IV. Uma vez cumpridos os critérios de aceitação definidos no anexo VI, o sistema de espectrofotometria por HPLC/UPLC é considerado qualificado e pronto para medir FD nas condições experimentais descritas nesta Diretriz de Teste.

Critérios de aceitação

44. Para cada ensaio que utilize lotes de tecidos RhCE, que cumprem o controle de qualidade (ver parágrafo 31), os tecidos tratados com a substância de controle negativo devem exibir DO que reflitam a qualidade dos tecidos submetidos à expedição, etapas de recepção e todos os processos do protocolo e não devem estar fora dos limites historicamente estabelecidos, descritos na tabela 2 (ver parágrafo 27). Da mesma forma, os tecidos tratados com a substância de controle positivo – acetato de metila (para VRM1 e VRM2), etanol (para LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, com protocolo líquido) ou ácido láurico (LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, com protocolo sólido) – deveriam mostrar uma viabilidade tecidular média $<$50% em relação ao controle negativo no VRM1 (com os protocolos líquidos ou sólidos, sendo $\leq$30% (protocolo líquido) ou $\leq$20% no protocolo dos sóli-

dos), em relação ao controle negativo, no VRM2, e ≤40% em relação ao controle negativo, no LabITte CORNEA-MODEL24 EIT, refletindo, assim, a capacidade dos tecidos para responder a uma substância química de teste de irritação sob as condições do teste[39-41]. A variabilidade entre as réplicas de substâncias de teste e substâncias de controle deve estar dentro dos limites aceitos (a diferença de viabilidade entre duas réplicas de tecido deve ser inferior a 20% ou o desvio padrão (SD) entre três réplicas de tecido não deve exceder 18%). Se o controle negativo ou o controle positivo, incluídos em uma execução, estiverem fora dos intervalos aceitos, a execução será considerada "não qualificada" e deverá ser repetida. Se a variabilidade entre as repetições tecidulares de uma substância química em teste estiver fora do intervalo aceito, o teste deve ser considerado "não qualificado" e a substância química em teste deve ser testada novamente.

Interpretação de Resultados e Modelo de Predição

45. Os valores de DO/áreas de pico obtidos com as amostras de réplicas, para cada produto químico em teste, devem ser usados para calcular a porcentagem média de viabilidade tecidular (média entre as repetições de tecido), normalizada para o controle negativo, que é estabelecido em 100%. O valor de corte percentual da viabilidade tecidular, para identificar substâncias químicas de teste que não exigem classificação para irritação ocular ou dano ocular grave (Sem Categoria do GHS), é dado na tabela 4. Os resultados devem, portanto, ser interpretados da seguinte forma:

- A substância química em estudo foi identificada como não exigindo classificação e rotulagem, de acordo com o GHS (Sem Categoria), se a porcentagem média de viabilidade tecidular após exposição e incubação pós-exposição for maior do que o valor-limite de viabilidade estabelecida mostrado na tabela 4. Neste caso, nenhum teste adicional em outros métodos de teste é necessário.
- Se a porcentagem média de viabilidade tecidular, após exposição e incubação pós-exposição, for menor ou igual ao valor-limite de viabilidade de tecido percentual estabelecido, nenhuma previsão pode ser feita a partir deste resultado isoladamente, como mostra a tabela 4. Neste caso, testes adicionais com outros métodos de teste serão necessários, porque os métodos de teste RhCE mostram um certo número de resultados falso positivos (ver parágrafos 14-16) e não podem ser resolvidos entre as Categorias 1 e 2 do GHS (ver parágrafo 18). O resultado "nenhuma previsão pode ser feita" do teste de RhCE, nesses casos, exigirá informações adicionais para fins de classificação – ver[3] para orientação.

Tabela 4: Modelos de previsão de acordo com a classificação GHS da ONU

Método de Teste	Sem categoria	Nenhuma previsão pode ser feita
EpicOcular™ EIT (ambos os protocolos)	Viabilidade tecidular média >60%	Viabilidade tecidular média ≤ 60%
SkinEthic™ HCE EiT (protocolos sólidos)	Viabilidade tecidular média >50%	Viabilidade tecidular média ≤ 60%
SkinEthic™ HCE EiT (protocolos líquidos)	Viabilidade tecidular média >60%	Viabilidade tecidular média ≤ 50%
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT (ambos os protocolos)	Viabilidade tecidular média >40%	Viabilidade tecidular média ≤ 40%

Método de teste e Sem Categoria Sem previsão

46. Um único teste, composto de, pelo menos, duas réplicas de tecido, deve ser suficiente para uma substância química em teste – quando o resultado é inequívoco. No entanto, em casos de resultados limítrofes, como medições replicadas não concordantes e/ou percentual médio de viabilidade tecidular igual a 60 ± 5% (VRM1 e VRM2, para o protocolo de líquidos), 50 ± 5% (VRM2, para protocolo de sólidos) ou 40 ± 5% (LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT), um segundo teste deve ser considerado, assim como um terceiro, no caso de resultados discordantes entre os dois primeiros testes.

47. As substâncias químicas de referência podem ser úteis para avaliar o potencial de dano ocular grave/irritação ocular das substâncias químicas em teste desconhecidas, ou classe de produto, ou para avaliar o potencial de toxicidade ocular relativo de uma substância química classificada dentro de uma faixa específica de respostas positivas.

DADOS E RELATÓRIOS

DADOS

48. Dados de réplicas de tecidos individuais em uma execução(por exemplo, valores de DO/áreas de pico de FD e porcentagem calculada de viabilidade de tecido para a substância química de teste e de controle, e a predição final do método de teste de RhCE devem ser relatados na forma de tabela, para cada substância

química de teste, incluindo dados de repetição de testes, conforme apropriado. Além disso, a porcentagem média de viabilidade do tecido e a diferença de viabilidade entre duas réplicas de tecido (se n=2 réplicas de tecido) ou SD (se n≥3 réplicas de tecido), para cada substância química de teste individual e de controle, devem ser relatadas. Quaisquer interferências observadas, de uma substância química em teste com a medição de FD através de redução direta de TD e/ou interferência colorida, devem ser relatadas para cada substância química testada.

RELATÓRIO DE TESTE

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

Produto químico em teste

- *Substância monoconstituinte*
  - Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) de registro CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores
  - Estado físico, volatilidade, pH, LogP, peso molecular, classe química e propriedades físico-químicas adicionais relevantes para a realização do estudo, na medida do disponível
  - Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente viável, etc.
  - Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
  - Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
- *Substância multiconstituinte, UVCB e misturas*
  - Caracterização, tanto quanto possível, com identidade química (ver acima), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver acima) dos constituintes, na medida em que estejam disponíveis
  - Estado físico e propriedades físico-químicas adicionais relevantes para a realização do estudo, na medida do disponível
  - Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente viável, etc.
  - Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
  - Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível

- *Substâncias de Controle Positivo e Negativo*
  - Identificação química, como nome(s) IUPAC ou CAS, número(s) de registro CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural e/ou outros identificadores
  - Estado físico, volatilidade, peso molecular, classe química e propriedades físico-químicas adicionais relevantes para a realização do estudo, na medida do disponível
  - Pureza, identidade química de impurezas, conforme apropriado e praticamente viável, etc.
  - Tratamento antes do teste, se aplicável (por exemplo, aquecimento, moagem)
  - Condições de armazenamento e estabilidade, na medida do possível
  - Justificativa para a utilização de um controle negativo diferente do previsto no anexo II, se aplicável
  - Justificativa para a utilização de um controle positivo diferente do previsto no anexo II, se aplicável
  - Referência aos resultados históricos positivos e negativos do controle, demonstrando critérios adequados de aceitação de execução
- *Informações sobre o patrocinador e a instalação de teste*
  - Nome e endereço do patrocinador, da instalação de teste e do diretor de estudo

Constructo do Tecido RhCE e Protocolos Usados (fornecendo justificativa para as escolhas, se aplicável)

Condições do Método de Teste

- Constructo de tecido RhCE utilizado, incluindo o número do lote
- Comprimento de onda e banda de passagem (se aplicáveis) usados para quantificar FD e intervalo de linearidade do dispositivo de medição (por exemplo, espectrofotômetro)
- Descrição do método usado para quantificar FD
- Descrição do sistema de espectrofotometria por HPLC/UPLC utilizado, se aplicável
- Informações completas de suporte sobre o constructo de tecido RhCE usado, incluindo seu desempenho. Isso deve incluir, mas não está limitado a:

i. Controle de qualidade de viabilidade (fornecedor);

ii. Viabilidade sob condições do método de teste (usuário);

iii. Controle de qualidade de função de barreira;

iv. Morfologia, se disponível;

v. Reprodutibilidade e capacidade preditiva;

vi. Outros controles de qualidade (CQ) da construção do tecido RhCE, se disponíveis.

- Referência a dados históricos do constructo de tecido RhCE. Isso deve incluir, mas não está limitado à aceitação dos dados de CQ com referência a dados históricos de lotes
- Declaração de que a instalação de o laboratório do uso de rotina, testando os químicos de proficiência

Os critérios de execução e aceitação

- Meios de controle positivo e negativo e faixas de aceitação, baseadas em dados históricos
- Variabilidade aceitável entre réplicas de tecidos para controles positivos e negativos
- Variabilidade aceitável entre as réplicas de tecido para a substância química em teste

Procedimento de Teste

- Detalhes do procedimento de teste utilizado
- Doses das substâncias químicas e de controle utilizadas
- Duração e temperatura de exposição, imersão pós-exposição e períodos de incubação pós-exposição (quando aplicável)
- Descrição de quaisquer modificações no procedimento de teste
- Indicação dos controles utilizados para redutores TD diretos e/ou substâncias químicas colorantes em teste, se aplicável
- Número de réplicas de tecido usadas por produto químico e controles (controle positivo, controle negativo, NSMTT ou NSWST, NSC_{living} e NSC_{killed}, se aplicável)

Resultados

- Tabulação de dados de substâncias químicas em teste individuais e substâncias de controle para cada execução (incluindo experimentos repetidos, quando aplicável) e cada medição das réplicas, incluindo valor de DO ou área de pico de FD, porcentagem de viabilidade tecidular, porcentagem média de viabilidade de tecido, diferença entre os tecidos replicados ou SD e previsão final
- Se aplicável, os resultados dos controles usados para redutores TD diretos e/ou substâncias químicas de teste coloridos, incluindo valor de DO ou área de pico de FD,% NSMTT ou % NSWST, % NSC_{living} e % NSC_{killed}. Diferença entre réplicas de tecido ou SD, porcentagem final correta de viabilidade tecidular e previsão final
- Resultados obtidos com o(s) produto(s) químico(s) e as substâncias de controle em relação aos critérios de aceitação de ensaio e execução definidos
- Descrição de outros efeitos observados; por exemplo, coloração dos tecidos por um químico de teste colorante

Discussão dos resultados

Conclusão

LITERATURA

(1) UN (2017). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.7, Seventh Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/ST-SG-AC10-30- Rev7e.pdf].

(2) OECD (2012). Guideline for Testing of Chemicals Nº 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(3) OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment Nº 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2013). Guideline for Testing of Chemicals Nº 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing

Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(5) OECD (2013). Guideline for Testing of Chemicals Nº 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(6) OECD (2012). Guideline for Testing of Chemicals Nº 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(7) OECD (2015). Guideline for Testing of Chemicals Nº 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. ALTEX 27, Special Issue 2010, 261-266.

(9) EC EURL ECVAM. (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280].

(10) EURL ECVAM Science Advisory Committee. (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcularTM EIT and SkinEthicTM HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC opinion Nº 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702].

(11) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi- laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. Toxicol. *In Vitro* 31, 43-53.

(12) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. Toxicol. *In Vitro* 34, 55-70.

(13) EURL ECVAM Science Advisory Committee. (2016). ESAC Opinion on the SkinEthicTM Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion Nº 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi:10.2787/390390. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704].

(14) Nakahara, S., Kojima, H., Omori, T., Yamashita, A., Endo, M., Satake, M., Nishiura, H., Shinoda, S., Hagiwara, S., Kasahara, T., Tahara, H., Yamamoto, Y., Ikeda, H., Yoshitake, Y., Lee, J. Ik., Han, Y., Lee, S., Sugawara, K., Katoh, M. A catch-up validation study of an in vitro eye irritation test method using reconstructed human corneal epithelial tissue, LabCyte CORNEA-MODEL24. (Manuscript submitted).

(15) OECD (2018). Peer Review Report on Validation status of the LabCyte CORNEA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST, OECD Series on Testing and Assessment Nº 282. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics 82, 377-390.

(17) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. Toxicol. *In Vitro* 24, 1-9.

(18) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(19) Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto. F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M., (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. Anal. Commun. 36, 47-50.

(20) OECD (2016). Series on Testing and Assessment Nº 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Recon-

structed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcularTM EIT and SkinEthicTM HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(21) OECD (2005). Series on Testing and Assessment Nº 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(22) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcularTM Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. Altern. Lab. Anim. 39, 339-364.

(23) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(24) Katoh, M., Uemura, N., Hamajima, F., Ogasawar,a T., Hata, K. (2012). Morphological characterization of a reconstructed human corneal epithelial model (LabCyte CORNEA-MODEL) as an alternative to the draize eye test for the assessment of eye irritation. AATEX. 17, 22-28.

(25) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcularTM reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. Toxicol. *In Vitro* 27, 619-626.

(26) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. Toxicol. *In Vitro* 27, 1476-1488.

(27) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara T., Hata, K. (2013). Establishment of a new *in vitro* test method for evaluation of eye irritancy using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL. Toxicol. *In Vitro*. 27, 2184-2192.

(28) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcularTM Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. Altern. Lab. Anim. 43, 1-18.
(29) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. Arch. Toxicol. 88, 701-723.
(30) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. Molecular Vision 17, 113-126.
(31) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749-815. WashinDTon, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
(32) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
(33) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 922-936.
(34) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. Reg. Tox. Pharmacol. 36, 106-117.
(35) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. Toxicol. *In Vitro* 15, 115-130.
(36) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 2610-2625.
(37) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. Cutan. Ocul. Toxicol. 25, 41-54.
(38) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De

Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). Arch. Toxicol. 91, 521-547.

(39) EpiOcularTM EIT SOP, Version 8. (March 05, 2013). EpiOcularTM EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(40) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(41) LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT SOP, Version 2.5.6. (February, 2017). LabCyte CORNEA- MODEL24 eye irritation test operation protocol. Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/06_11/06_11_E1.pdf].

(42) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC- Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Toxicol. *In Vitro* 29, 741-761.

(43) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcularTM Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. Altern. Lab Anim. 43, 101-127.

ANEXO I

Definições

Precisão: a proximidade da concordância entre os resultados do método de teste e os valores de referência aceitos. É uma medida do desempenho do método de teste e um aspecto de "relevância". O termo é frequentemente usado de forma intercambiável com "concordância", para significar a proporção de resultados corretos de um método de teste[21].

Produto químico de referência: uma substância química utilizada como padrão para comparação com uma substância química em teste. Uma substância química de referência deve ter as seguintes propriedades: (i) fonte(s) consistente(s) e confiável(is) para sua identificação e caracterização; (ii) similaridade estrutural, funcional e/ou química ou de classe de produto ao(s) produto(s) químico(s) testado(s); (iii) características físico-químicas conhecidas; (iv) dados de apoio sobre efeitos conhecidos; e (v) potência conhecida no intervalo da resposta desejada.

Abordagem Bottom-Up: abordagem passo a passo usada para um teste químico suspeito de não exigir classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular grave, que começa com a determinação de substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem (resultado negativo) e resultado de outros substâncias químicas[3].

Produto químico: uma substância ou mistura. Concordância (ver "Precisão").

Córnea: a parte transparente da frente do globo ocular que cobre a íris e a pupila e admite a luz para o interior.

CV: coeficiente de variação.

Dev: desvio.

EIT: Teste de Irritação dos Olhos.

EURL ECVAM: Laboratório de Referência da União Europeia para Alternativas aos Ensaios em Animais.

Irritação ocular: produção de alterações oculares após a aplicação de uma substância química em teste na superfície anterior do olho, que são totalmente reversíveis dentro de 21 dias após a aplicação. Intercambiável com "Efeitos oculares reversíveis" e com "Categoria 2 do GHS"[1].

ET_{50}*:* tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade dos tecidos em 50% com a aplicação de uma substância química de referência, em concentração fixa e específica.

Taxa de Falso Negativo: a proporção de todas as substâncias positivas que são erroneamente identificadas por um método de teste como negativas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Taxa de Falsa Positivo: a proporção de todas as substâncias negativas que são erroneamente identificadas por um método de teste como positivas. É um indicador do desempenho do método de teste.

Corante Formazan (FD): produto cromogênico da redução de MTT e WST-8.

Risco: propriedade inerente de um agente ou uma situação com potencial para causar efeitos adversos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto a esse agente.

HCE: Epitélio da córnea humana SkinEthic™.

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

IC_{50}*:* concentração na qual uma substância química de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50% após um tempo de exposição fixo (por exemplo, 30 ou 60 minutos de tratamento com SDS).

Dose infinita: quantidade de produto químico em teste aplicado ao constructo de tecido RhCE, que excede a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície epitelial.

Efeitos oculares irreversíveis: Ver "Lesões oculares graves".

LLOQ: Limite inferior de quantificação.

LogP: Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.

Mistura: uma mistura ou solução composta de duas ou mais substâncias nas quais elas não reagem[1].

Substância monoconstituinte: substância definida pela sua composição quanti-

tativa, na qual um constituinte principal está presente em pelo menos 80% (p/p).

Substância multiconstituinte: substância definida pela sua composição quantitativa, em que mais de um constituinte principal está presente na concentração ≥10% (p/p) e <80% (p/p). Uma substância multiconstituinte é o resultado de um processo de fabricação. A diferença entre mistura e substância multiconstituinte é que uma mistura é obtida pela mistura de duas ou mais substâncias sem reação química. Uma substância multiconstituinte é o resultado de uma reação química.

MTT: brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio; brometo de tetrazólio azul de tiazolilo (CAS RN 298-93-1).

Controle negativo: uma amostra contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratada com uma substância conhecida por não induzir uma resposta positiva no sistema de teste. Esta amostra é processada com amostras tratadas quimicamente e outras amostras de controle e é usada para determinar 100% de viabilidade tecidular.

Não classificado: substâncias químicas que não são classificados para irritação ocular (Categorias 2, 2A ou 2B do GHS) ou Lesões oculares graves (Categoria 1 do GHS). Intercambiável com “Sem categoria do GHS”.

NSC_{killed}*:* cor não específica em tecidos mortos.

NSC_{living}*:* cor não específica em tecidos vivos.

NSMTT: redução de MTT não específica.

NSWST: redução não específica do WST-8.

DO: densidade óptica.

Padrões de desempenho: padrões baseados em um método de teste validado que foi considerado cientificamente aceitável, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método de teste proposto que seja mecânica e funcionalmente similar. Incluem-se: (i) componentes essenciais do método de

teste; (ii) uma lista mínima de Substâncias Químicas de Referência selecionadas dentre as substâncias químicas utilizadas para demonstrar o desempenho aceitável do método de teste validado; e (iii) os níveis comparáveis de precisão e confiabilidade, com base no que foi obtido para o método de teste validado, que este método de teste proposto deve demonstrar quando avaliado usando-se a lista mínima de Referência de Substâncias Químicas[21].

Controle positivo: uma amostra contendo todos os componentes de um sistema de teste e tratada com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva no sistema de teste. Esta amostra é processada com amostras tratadas com substâncias químicas em teste e outras amostras de controle. Para garantir que a variabilidade na resposta do controle positivo ao longo do tempo possa ser avaliada, a magnitude da resposta positiva não deve ser demasiada.

Relevância: descrição da relação do teste com o efeito de interesse e se é significativo e útil para uma finalidade específica. É a medida de que o teste mede ou prevê corretamente o efeito biológico de interesse. Relevância incorpora a consideração da precisão (concordância) de um método de teste[19].

Confiabilidade: mede a extensão em que um método de teste pode ser executado reprodutivelmente, dentro e entre laboratórios ao longo do tempo, usando o mesmo protocolo. Avalia-se calculando a reprodutibilidade intra e interlaboratorial e a repetibilidade intralaboratorial[21].

Teste de substituição: um teste projetado para substituir outro que está sendo usado rotineiramente e é aceito para identificação de perigos e/ou avaliação de risco; o teste de substituição é determinado para fornecer proteção equivalente ou melhorada da saúde humana, animal ou do meio ambiente, como aplicável, em comparação com o teste aceito e rotineiro, para todas as possíveis situações de teste e substâncias químicas[21].

Reprodutibilidade: a concordância entre os resultados obtidos a partir de testes repetidos do mesma substância química, usando o mesmo protocolo de teste (ver "Confiabilidade")[21].

Efeitos oculares reversíveis: Ver "Irritação ocular".

RhCE: Epitélio Reconstruído em forma de Córnea Humana.

Execução: consiste em uma ou mais substâncias químicas em teste sendo avaliadas simultaneamente com um controle negativo e com um controle positivo.

SD ou DP: desvio padrão.

Sensibilidade: a proporção de todos as substâncias químicas de teste positivas/ativas que são classificadas corretamente pelo teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos, sendo de grande importância na avaliação da relevância de um método de teste[21].

Lesões oculares graves: produção de danos nos tecidos oculares ou grave declínio físico da visão, após a aplicação de uma substância química em teste na superfície ocular anterior, que não é totalmente reversível dentro de 21 dias da aplicação. Intercambiável com "efeitos oculares irreversíveis" e com "Categoria 1 do GHS"[1].

Procedimentos Operacionais Padrão (POP ou SOP): procedimentos formais que descrevem detalhadamente como a rotina específica e as operações laboratoriais específicas do teste devem ser realizados. Eles são exigidos pelo GLP.

Especificidade: a proporção de todas as substâncias químicas de teste negativas/inativas que são classificadas corretamente pelo teste. É uma medida de precisão para um método de teste que produz resultados categóricos, sendo de grande importância na avaliação da relevância de um método de teste[21].

Substância: elementos químicos e seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade da substância e quaisquer impurezas derivadas do processo usado. Excluindo-se qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância ou sem alterar a sua composição[1].

Teste: um única substância química testada concorrentemente em um mínimo de duas réplicas de tecido, conforme definido no POP correspondente.

Tintura de tetrazólio (TD): sais de tetrazólio MTT e WST-8.

Viabilidade tecidular: parâmetro que mede a atividade total de uma população celular em um tecido reconstruído, como sua capacidade de reduzir o corante vital MTT, que, dependendo do ponto final medido e do desenho do teste utilizado, correlaciona-se com o número total e/ou a vitalidade das células vivas.

Abordagem de cima para baixo (Top-down): abordagem passo a passo usada para uma substância química suspeita de causar lesões oculares graves, que começa com a determinação de substâncias químicas que induzem danos oculares graves (resultado positivo) de outras substâncias químicas (resultado negativo)[3].

Substância química em teste: é usado para se referir ao que está sendo testado.

Estratégia de teste em camadas: uma estratégia de teste escalonada, que usa métodos de teste de maneira sequencial. Todas as informações existentes sobre uma substância química em teste são revisadas em cada nível, usando um processo baseado em evidência, para determinar se há informações suficientes disponíveis para uma decisão de classificação de perigo, antes da progressão para o próximo nível da estratégia. Se o potencial/a potência de risco de uma substância química em teste puder ser atribuído com base nas informações existentes em um determinado nível, nenhum teste adicional é necessário[21].

ULOQ: Limite Superior de Quantificação.

Sistema Global Harmonizado das Nações Unidas de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS da ONU): um sistema que propõe a classificação de substâncias químicas (substâncias e misturas), de acordo com tipos e níveis padronizados de riscos físicos, de saúde e ambientais, abordando elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, declarações de perigo, declarações de precaução e fichas de segurança, para transmitir informações sobre os seus efeitos adversos com vista a proteger as pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e socorristas) e o ambiente[1].

Categoria 1 do GHS: ver “Lesões oculares graves”.

Categoria 2 do GHS: ver "Irritação ocular".

Sem Categoria no GHS: substâncias químicas que não atendem aos requisitos para classificação como Categoria 1 ou 2 (2A ou 2B) do GHS. Intercambiável com "Não classificado".

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra-Alto Desempenho.

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

Método de teste válido: um método de teste considerado como tendo relevância e confiabilidade suficientes para um propósito específico e que seja baseado em princípios cientificamente sólidos. Um método de teste nunca é válido em um sentido absoluto, mas apenas em relação a um propósito definido[21].

Método de teste validado: um método de teste para o qual estudos de validação foram concluídos para determinar a relevância (incluindo precisão) e a confiabilidade para um propósito específico. É importante destacar que um método de teste validado pode não ter desempenho suficiente em termos de precisão e confiabilidade para ser considerado aceitável para o propósito proposto[21].

VRM ou MRV: Método de referência validado.

VRM1: EpiOcular™ EIT é referido como o Método de Referência Validado 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT é referido como o Método de Referência Validado 2.

Baseado em evidência: o processo de considerar os pontos fortes e fracos de várias informações para alcançar e apoiar uma conclusão sobre o potencial risco de uma substância química em teste.

WST: Sal de tetrazólio solúvel em água.

WST-8: Sal de tetrazólio solúvel em água-8. [2- (2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) -2H-tetrazólio, sal monossódico (CAS RN 193149-74-5).

ANEXO II

Principais componentes do método de teste rhce validados para a identificação de substâncias químicas que não requerem classificação e rotulagem para a irritação ocular ou danos oculares graves

Componente do método de teste	EpiOcular™ EIT (VRM2)		SkinETHIC™ HCE EIT (VRM2)		LabCyte CORNEA-MODAL24 EIT	
Protocolo	Líquido (pipetável a 37+1C ou temperaturas menores por 15 minutos)	Sólido (não pipetável)	Líquido e viscoso (pipetável)	Sólido (não pipetável)	Líquido (pipetável)	Sólido (não pipetável)
Superfície de modelo	0,6cm^2	0,6cm^2	0,5cm^2	0,5cm^2	0,3cm^2	0,3cm^3
Número de réplicas de tecido	Ao menos 2	Ao menos 2	Ao menos 2	Ao menos 2	3 tecidos	3 tecidos
Pré-verificação para interferência de cor	50 μL + 1 mL de H2O por 60 min a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% de CO2, ≥95% RH (substâncias químicas não coloridas) ou 50 μL + 2 mL de isopropanol misturados por 2-3h à temperatura ambiente) → se a DO do produto químico em teste a 570 ± 20 nm, após subtração da DO para isopropanol ou água for > 0,08 (o que corresponde a aproximadamente 5% da DO média do controle negativo), os controles adaptados vivos devem ser executados	50 μL + 1 mL de H2O por 60 min a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% de CO2, ≥95% RH (substâncias químicas não coloridas) ou 50 μL + 2 mL de isopropanol misturados por 2-3h à temperatura ambiente) → se a DO do produto químico em teste a 570 ± 20 nm, após subtração da DO para isopropanol ou água for > 0,08 (o que corresponde a aproximadamente 5% da DO média do controle negativo), os controles adaptados vivos devem ser executados	10 μl + 90 μL de H2O misturados durante 30 ± 2 min à temperatura ambiente (temperatura do ambiente de 18-28ºC) → se o produto químico em estudo for colorido, os controles adaptados vivos devem ser realizados	10 μl + 90 μL de H2O misturados durante 30 ± 2 min à temperatura ambiente (temperatura do ambiente de 18-28ºC) → se o produto químico em estudo for colorido, os controles adaptados vivos devem ser realizados	50 μL + 0,5 mL de água destilada misturada por 15 minutos a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% de CO2, ≥95% RH. → Se o produto químico de teste for colorido, os controles vivos adaptados devem ser realizados	50 μL + 0,5 mL de água destilada misturada por 15 minutos a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% de CO2, ≥95% RH. → Se o produto químico de teste for colorido, os controles vivos adaptados devem ser realizados

Componente do método de teste	EpiOcular™ EIT (VRM2)		SkinETHIC™ HCE EIT (VRM2)		LabCyte CORNEA-MODAL24 EIT	
Protocolo	Líquido (pipetável a 37+1C ou temperaturas menores por 15 minutos)	Sólido (não pipetável)	Líquido e viscoso (pipetável)	Sólido (não pipetável)	Líquido (pipetável)	Sólido (não pipetável)
Pré-verificação redução direta do MTT	50 µL + 1 mL de solução de MTT 1 mg / mL por 180 ± 15 min a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% CO2, ≥95% RH. → Se a solução se tornar azul/ púrpura, os controles de mortos por congelamento adaptados devem ser realizados (50 µL de água desionizada estéril em solução de MTT é usada como controle negativo)	50 µL + 1 mL de solução de MTT 1 mg / mL por 180 ± 15 min a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% CO2, ≥95% RH. → Se a solução se tornar azul/ púrpura, os controles de mortos por congelamento adaptados devem ser realizados (50 µL de água desionizada estéril em solução de MTT é usada como controle negativo)	30 µL + 300 µL de solução MTT 1 mg / mL por 180 ± 15 min a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% CO2, ≥95% RH. → Se a solução se tornar azul/ púrpura, devem ser realizados controles de mortos por água adaptados (30 µL de água desionizada estéril em solução de MTT é usada como controle negativo)	30 µL + 300 µL de solução MTT 1 mg / mL por 180 ± 15 min a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% CO2, ≥95% RH. → Se a solução se tornar azul/ púrpura, devem ser realizados controles de mortos por água adaptados (30 µL de água desionizada estéril em solução de MTT é usada como controle negativo)	50 µL + 300 µL de meio WST-8 diluído por 240 ± 20 minutos a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% CO2, ≥95% RH. → Se a solução se tornar amarela, devem ser realizados controles de mortos por congelamento adaptados- devem ser realizados	10 µL + 300 µL de meio WST-8 diluído por 240 ± 20 minutos a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% CO2, ≥95% RH → Se a solução se tornar amarela, devem ser realizados controles de mortos por congelamento adaptados devem ser realizados
Pré-tratamento	20 µL de DPBS isento de Ca^{2+} / Mg^{2+} por 30 ± 2 min a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% de CO2, ≥95% de HR, protegido da luz.	20 µL de DPBS isento de Ca^{2+} / Mg^{2+} por 30 ± 2 min a 37 ± 2ºC, 5 ± 1% de CO2, ≥95% de HR, protegido da luz.				
Doses de tratamento e aplicação	50 µL (83.3 µL/ cm^2)	50 mg (83.3 mg/ cm^2) usando uma ferramenta calibrada (como uma colher de sopa nivelada calibrada para conter 50 mg de cloreto de sódio).	10 µL de Ca^{2+}/ Mg^{2+} livre de DPBS + 30 ± 2 µL (60 µL/cm^2). Para viscosos, use uma tela de nylon.	30 µL de Ca^{2+}/ Mg^{2+} livre de DPBS + 30 ± 2mg(60 mg/cm^2)	50 µL (167 µL/ cm^2)	10 mg (33 mg/cm^2)
Tempo de exposição e temperatura	30 min (± 2 min) em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH	6 horas (± 0,25 h) em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH	30 min (± 2 min) em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH	4 horas (±1 h) em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH	1 min (± 5 segundos) em meio de cultura a temperatura ambiente	24 horas (±15 h) em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH
Enxague à temperatura ambiente	"3 vezes em 100 mL de Ca^{2+}/Mg^{2+} sem DPBS"	"3 vezes em 100 mL de Ca^{2+}/Mg^{2+} sem DPBS"	20 mL de Ca^{2+}/ Mg^{2+} sem DPBS	25 mL de Ca^{2+}/ Mg^{2+} sem DPBS	"10 vezes ou mais em fluxo de Ca^{2+}/Mg^{2+} sem DPBS"	"10 vezes ou mais em fluxo de Ca^{2+}/ Mg^{2+} sem DPBS"

Componente do método de teste	EpiOcular™ EIT (VRM2)		SkinETHIC™ HCE EIT (VRM2)		LabCyte CORNEA-MODAL24 EIT	
Protocolo	Líquido (pipetável a 37+1C ou temperaturas menores por 15 minutos)	Sólido (não pipetável)	Líquido e viscoso (pipetável)	Sólido (não pipetável)	Líquido (pipetável)	Sólido (não pipetável)
Imersão pós-exposição	12 minutos (± 2 min) a temperatura ambiente em meio de cultura	25 minutos (± 2 min) a temperatura ambiente em meio de cultura	30 minutos (± 2 min) a 37ºC, 5% CO2, 95% RH em meio de cultura	30 minutos (± 2 min) a temperatura ambiente em meio de cultura		
Incubação pós-exposição	120 minutos (± 15 min)em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH	18 horas (± 0,25h)em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH	Nenhum	18 horas (± 0,5h) em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH	24 horas (± 0,25h)em meio de cultura a 37±2ºC, 5±1% CO2, ≥95% RH	Nenhum
Controle Negativo	50 µL de H_2O testado simultaneamente	50 µL de H_2O testado simultaneamente	30 ± 2µL Ca^{2+}/Mg^{2+} sem DPBS, testado simultaneamente	30 ± 2µL Ca^{2+}/Mg^{2+} sem DPBS, testado simultaneamente	50 µL de Ca^{2+}/Mg^{2+} sem DPBS, testado simultaneamente	Nenhum-tratamento testado simultaneamente
Controle Positivo	50 µL de Acetato de metilo, testado simultaneamente	50 µL de Acetato de metilo, testado simultaneamente	30+2 µL de Acetato de metilo, testado simultaneamente	30+2 µL de Acetato de metilo, testado simultaneamente	50 µL de Etanol, testado simultaneamente	10mg de ácido láurico, testado simultaneamente
Solução salina de tetrazólio	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL de solução WST-8 diluída (diluição de 10 vezes de CCK-8)	300 µL de solução WST-8 diluída (diluição de 10 vezes de CCK-8)
Solvente de Extração	2 mL de isopropanol (extração da parte superior e inferior da inserção perfurando o tecido)	2 mL de isopropanol (extração da parte superior e inferior da inserção perfurando o tecido)	1,5 mL de isopropanol (extração da parte superior e inferior da inserção)	1,5 mL de isopropanol (extração da parte superior e inferior da inserção)	Não necessária	Não necessária
Tempo de extração e Temperatura	2 - 3 h com agitação (aproximadamente 120 rpm) em temperatura ambiente ou durante a noite a 4-10 °C	2 - 3 h com agitação (aproximadamente 120 rpm) em temperatura ambiente ou durante a noite a 4-10 °C	4 h com agitação (aproximadamente 120 rpm) em temperatura ambiente ou durante a noite a 4-10 °C	Ao menos 2h com agitação (aprox. 120 rpm) a temperatura ambiente	Não necessária	Não necessária
Leitura de DO	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	450 nm com filtro de referência (650 nm)	450 nm com filtro de referência (650 nm)

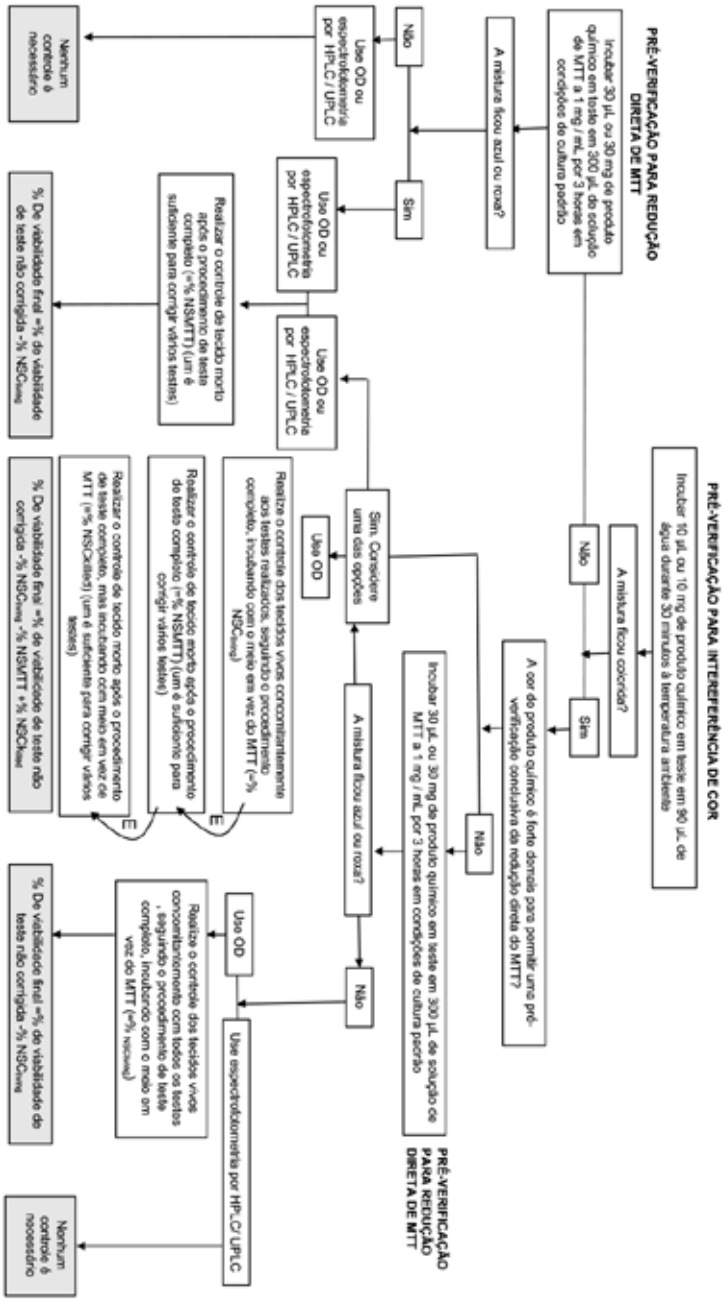
Componente do método de teste	EpiOcular™ EIT (VRM2)		SkinETHIC™ HCE EIT (VRM2)		LabCyte CORNEA-MODAL24 EIT	
Protocolo	Líquido (pipetável a 37±1C ou temperaturas menores por 15 minutos)	Sólido (não pipetável)	Líquido e viscoso (pipetável)	Sólido (não pipetável)	Líquido (pipetável)	Sólido (não pipetável)
Controle de Qualidade do Tecido	Tratamento com 100 μL de Triton X-100 a 0,3% (v / v) 12,2 min ≤ ET50 ≤ 37,5 min	Tratamento com 100 μL de Triton X-100 a 0,3% (v / v) 12,2 min ≤ ET50 ≤ 37,5 min	30 min tratamento com SDS (50 μL) 1,0 mg / mL ≤ IC50 ≤ 3,5 mg / mL	30 min tratamento com SDS (50 μL) 1,0 mg / mL ≤ IC50 ≤ 3,5 mg / mL	60 minutos de tratamento com SDS (25 μL) 1,0 mg / mL ≤ IC50 ≤ 4,0 mg / mL	60 minutos de tratamento com SDS (25 μL) 1,0 mg / mL ≤ IC50 ≤ 4,0 mg / mL
Critério de Aceitação	1. A DO média das replicações teciduais tratadas com o controle negativo deve ser > 0,8 e <2,5 2. A viabilidade média das replicações teciduais expostas por 30 minutos com o controle positivo, expresso como% do controle negativo, deve ser <50% 3. A diferença de viabilidade entre duas replicações de tecido deve ser inferior a 20%.	1. A DO média das replicações teciduais tratadas com o controle negativo deve ser> 0,8 e <2,5 2. A viabilidade média das replicações teciduais expostas por 30 minutos com o controle positivo, expresso como% do controle negativo, deve ser <50% 3. A diferença de viabilidade entre duas replicações de tecido deve ser inferior a 20%.	1. A DO média das replicações teciduais tratadas com o controle negativo deve ser> 1,0 e ≤ 2,5 2. A viabilidade média das replicações teciduais expostas por 30 minutos com o controle positivo, expresso como% do controle negativo, deve ser ≤ 30% 3. A diferença de viabilidade entre duas replicações de tecido deve ser inferior a 20%.	1. A DO média das replicações teciduais tratadas com o controle negativo deve ser> 1,0 e ≤ 2,5 2. A viabilidade média das replicações teciduais expostas por 4 horas com o controle positivo, expresso como% do controle negativo, deve ser ≤ 20% 3. A diferença de viabilidade entre duas replicações de tecido deve ser inferior a 20%.	1. A DO média das replicações teciduais tratadas com o controlo negativo deve ser ≥ 0,5 e ≤ 1,3. 2. A viabilidade média das replicações tecidulares tratadas com o controlo positivo deve ser ≤ 40% 3. O desvio padrão (DP) entre três repetições de tecidos não deve exceder 18%	1. A DO média das replicações teciduais tratadas com o controlo negativo deve ser ≥ 0,5 e ≤ 1,3. 2. A viabilidade média das replicações tecidulares tratadas com o controlo positivo deve ser ≤ 40% 3. O desvio padrão (DP) entre três repetições de tecidos não deve exceder 18%

ANEXO III

Fluxograma ilustrativo para orientação sobre como identificar e manipular substâncias químicas redutoras de MTT e/ou interferentes de cores, com base no POP do VRM1

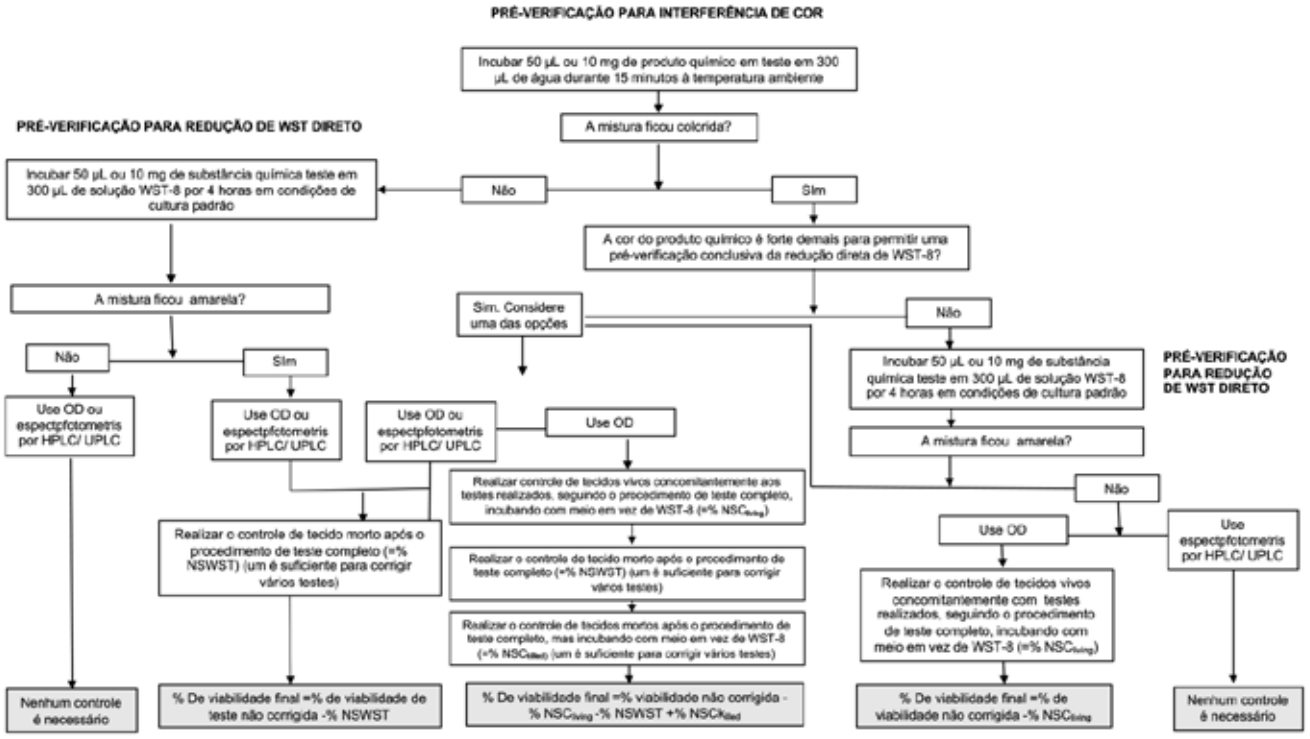
ANEXO IV

Fluxograma ilustrativo para orientação sobre como identificar e manusear redutores de MTT diretos e/ou químicos interferentes de cores, com base no POP do VRM2



ANEXO V

Fluxograma ilustrativo para orientação sobre como identificar e manusear substâncias químicas de redução de resíduos e/ou cores interferentes, com base no POP soft de labcyte cornea-model24



ANEXO VI

Principais parâmetros e critérios de aceitação para qualificação de um sistema de espectrofotometria por HPLC/UPLC para medição de MTT formazanas extraídas de constructos de tecido RHCE

Parâmetro	Protocolo Derivado da Orientação do FDA (43;45)	Critérios de Aceitação
Seletividade	Análise de isopropanol, resíduo branco vivo (extrato de isopropanol a partir de construções teciduais de RhCE vivas sem qualquer tratamento) branco morto (extrato de isopropanol de construções de tecido de RhCE mortas sem qualquer tratamento), e de um corante (por exemplo, azul de metileno)	Interferência de área $\leq$ 20% da AreaLLOQ [1]
Precisão	Controles de Qualidade (ou seja, MTT formazan a 1,6 μg / mL, 16 μg / mL e 160 μg / mL) em isopropanol (n = 5)	CV $\leq$ 15% ou $\leq$ 20% para o LLOQ
Acuracidade	Controles de qualidade em isopropanol (n = 5)	% De Dev $\leq$ 15% ou $\leq$ 20% para LLOQ
Efeito de matriz	Controles de qualidade em isopropanol (n = 5)	85% $\leq$ % Efeito de Matriz $\leq$ 115%
Transferência	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ[2]	$Area_{interferência} \leq$ 20% da $Area_{LLOQ}$
Reprodutibilidade (intra-dia)	3 curvas de calibração independentes (com base em 6 diluições consecutivas de 1/3 de MTT formazan em isopropanol começando em ULOQ, isto é, 200 μg / mL); Controles de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curvas de Calibração: %Dev $\leq$ 15% ou $\leq$ 20% para Controle de Qualidade do: %Dev $\leq$ 15% e CV $\leq$ 15%
Reprodutibilidade (inter-dia)	Dia 1: 1 curva de calibração e controles de qualidade em isopropanol (n = 3); Dia 2: 1 curva de calibração e e controlos de qualidade em isopropanol (n = 3); Dia 3: 1 curva de calibração de controles de qualidade em isopropanol (n = 3).	
Estabilidade de curto prazo do MTT formazan em Extrato de tecido RhCE	Controles de Qualidade em branco vivo (n = 3) analisados no dia da preparação e após 24 horas de armazenamento à temperatura ambiente	%Dev $\leq$ 15%
Estabilidade de longo prazo do MTT formazan em Extrato de tecido RhCE, se exigido	Controles de Qualidade em branco vivo (n = 3) analisados no dia da preparação e após vários dias de armazenamento a -20° C	%Dev $\leq$ 15%

[1] LLOQ: Limite Inferior de Quantificação, definido para cobrir 1-2% de viabilidade tecidular, ou seja, 0,8µg/mL.

[2] ULOQ: Limite Superior de Quantificação, definido como sendo pelo menos duas vezes maior do que a maior concentração de FORTON de MTT esperado em extratos de isopropanol de controles negativos (~ 70µg/mL no VRM), ou seja, 200µg/mL.

Diretrizes OECD para teste De substâncias químicas - 432

Teste de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU

INTRODUÇÃO

1. A fototoxicidade é definida como uma resposta tóxica a uma substância aplicada no corpo que é provocada ou aumentada (aparente em doses mais baixas) após a exposição subsequente à luz ou, que é induzida pela irradiação da pele após a administração sistêmica de uma substância.

2. O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU é utilizado para identificar o potencial fototóxico de uma substância química de ensaio, induzida após a exposição à luz. O teste avalia a fotocitotoxicidade pela redução relativa na viabilidade de células expostas à substância química, em presença *versus* ausência de luz. As substâncias identificadas por este teste são possivelmente fototóxicas *in vivo*, após aplicação e distribuição sistêmicas na pele ou após aplicação tópica.

3. Definições usadas são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

4. Muitos tipos de substâncias químicas foram relatados como indutores de efeitos fototóxicos[1-4]. Sua característica comum é a capacidade de absorver a energia da luz dentro da faixa da luz solar. De acordo com a primeira lei da fotoquímica (Lei Grotthaus-Draper), a fotorreação requer absorção suficiente de quanta de luz. Assim, antes de serem considerados os ensaios biológicos, um espectro de absorção UV/vis, da substância química em teste, deve ser determinado de acordo com a Diretriz 101. Tem sido sugerido que, se o coeficiente de extinção/absorção molar for inferior a 10 litros x mol-1 x cm-1, é improvável que a substância química seja fotorreativa. Tal substância química pode não precisar ser testada para fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU ou qualquer outro teste biológico para efeitos fotoquímicos adversos[1,5]. Veja também o anexo 2.

5. A confiabilidade e a relevância do teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU foram avaliadas recentemente[6-9]. O teste de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU mos-

trou ser preditivo de efeitos de fototoxicidade aguda em animais e humanos *in vivo*. O teste não foi projetado para prever outros efeitos adversos, que possam surgir da ação combinada de uma substância química e luz, por exemplo; não aborda fotogenotoxicidade, fotoalergia ou fotocarcinogenicidade, nem permite uma avaliação da potência fototóxica. Contudo, o ensaio não foi concebido para abordar os mecanismos indiretos de fototoxicidade, os efeitos dos metabólitos da substância em estudo ou os efeitos das misturas.

6. Considerando que a utilização de sistemas de metabolização é um requisito geral para todos os testes *in vitro* na previsão do potencial genotóxico e carcinogênico, até agora, no caso da fototoxicologia, existem apenas exemplos raros em que é necessária a transformação metabólica para o químico agir como uma fototoxina in vivo ou *in vitro*. Assim, não é considerado, nem necessário, nem cientificamente justificado realizar um sistema de ativação metabólica para o presente teste.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE TESTE

7. O teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU baseia-se numa comparação da citotoxicidade de uma substância química, quando testada na presença e na ausência de exposição a uma dose não citotóxica de luz solar simulada. A citotoxicidade neste teste é expressa como uma redução concentração-dependente da absorção do corante vital Vermelho Neutro (NR) medido 24 horas após o tratamento, com a substância química em teste e a irradiação[10]. O NR é um corante catiônico fraco que penetra rapidamente nas membranas celulares por não difusão, acumulando-se intracelularmente nos lisossomos. Alterações da superfície celular da membrana lisossomal sensível levam à fragilidade lisossomal e a outras alterações que gradualmente se tornam irreversíveis. Tais mudanças, provocadas pela ação de xenobióticos, resultam em menores absorção e ligação de NR. Assim, fica possível distinguir entre células viáveis, danificadas ou mortas – que é a base deste teste.

8. Células Balb/c 3T3 são mantidas em cultura por 24h para formação de monocamadas. Duas placas de 96 poços por substância química teste são pré-incubadas com oito concentrações diferentes da substância teste por uma hora. Depois disso, uma das duas placas é exposta à maior dose de irradiação não

citotóxica, enquanto a outra placa é mantida no escuro. Em ambas as placas, o meio de tratamento é substituído por meio de cultura e, após outras 24h de incubação, a viabilidade celular é determinada pela absorção de Vermelho Neutro. A viabilidade celular é expressa como percentagem de controle de solventes não tratados e é calculada para cada concentração de teste. Para prever o potencial fototóxico, as respostas de concentração obtidas na presença e na ausência de irradiação são comparadas, normalmente ao nível de IC50, ou seja, a concentração reduzindo a viabilidade celular a 50%, em comparação com os controles não tratados.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE TESTE

Preparações

Células

9. Uma linhagem permanente de células de fibroblastos de rato, Balb/c 3T3, clone 31, quer da Coleção Americana de Tipo de Cultura (ATCC), Manassas, VA, EUA, quer da Coleção Europeia de Culturas Celulares (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Reino Unido, foi utilizada no estudo de validação e, portanto, recomenda-se que as células sejam obtidas a partir de um depositário de células bem qualificado. Outras células ou linhagens celulares podem ser usadas com o mesmo procedimento de teste se as condições de cultura forem adaptadas às necessidades específicas das células, mas sua equivalência deve ser demonstrada.

10. Células devem ser checadas regularmente, para a falta de contaminação de micoplasma, e devem ser usadas apenas se nenhuma contaminação for encontrada[11].

11. É importante que a sensibilidade UV das células seja verificada regularmente, de acordo com o procedimento de controle de qualidade descrito nesta diretriz. Uma vez que a sensibilidade UVA das células pode aumentar com o número de passagens, devem ser utilizadas células Balb/c 3T3 com o menor número de passagens obtido, de preferência menos de 100 (ver parágrafo 29 e anexo 3).

Meios e condições da cultura

12. Devem ser utilizados meios de cultura e condições de incubação apropriados para a passagem celular de rotina e durante o procedimento de teste. Por exem-

plo, para células Balb/c 3T3, são DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro de vitelo recém-nascido, 4mM glutamina, penicilina (100UI) e estreptomicina (100μg/mL) e incubação umedecida a 37°C, 5-7,5% CO_2 dependendo do tampão (ver parágrafo 17). É particularmente importante que as condições da cultura celular assegurem o tempo de ciclo celular dentro do intervalo histórico normal das células ou da linhagem celular utilizada.

Preparação das culturas

13. Células de culturas congeladas são semeadas em um meio de cultura à densidade apropriada e subcultivadas, pelo menos uma vez, antes de serem utilizadas no teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.

14. As células utilizadas para o teste de fototoxicidade são semeadas em meio de cultura na densidade apropriada, de modo que as culturas não atinjam confluência no final do teste; isto é, quando a viabilidade celular é determinada 48h após a sementeira das células. Para células Balb/c 3T3 cultivadas em placas de 96 poços, a densidade de semeadura celular recomendada é de 1 x 104 células por poço.

15. Para cada teste de substância química, as células são semeadas de forma idêntica em duas placas separadas de 96 poços, que são tomadas simultaneamente, através de todo o procedimento de teste, sob condições de cultura idênticas, exceto pelo período em que uma das placas é irradiada (+Irr) e a outra é mantida no escuro (-Irr).

Preparação da substância teste

16. As substâncias de teste devem ser preparadas imediatamente antes do uso, a menos que os dados demonstrem sua estabilidade no armazenamento. Recomenda-se que todo o manuseamento das substâncias químicas e o tratamento inicial das células sejam realizados sob condições de luz que evitem a fotoativação ou a degradação da substância em estudo antes da irradiação.

17. As substâncias químicas de teste devem ser dissolvidas em soluções salinas tamponadas – por exemplo, Solução Salina Equilibrada de Earle (EBSS) ou outras soluções tamponadas, fisiologicamente equilibradas – que devem estar isentas de componentes proteicos e componentes absorvedores de luz (cores indicadoras de pH e vitaminas) para evitar interferência durante a irradiação. Uma

vez que, durante a irradiação as células são mantidas cerca de 50 minutos fora da incubadora de CO_2, deve-se ter cuidado para evitar a alcalinização. Se tampões fracos, como o EBSS, são usados, isso pode ser conseguido através da incubação das células a 7,5% de CO_2. Se as células forem incubadas a 5% de CO_2 apenas, um tampão mais forte deve ser selecionado.

18. As substâncias químicas de teste de solubilidade limitada em água devem ser dissolvidas em solvente apropriado. Se for utilizado solvente, este deve estar presente em volume constante em todas as culturas, isto é, nos controles negativos (solvente), bem como em todas as concentrações da substância química em teste – e não ser citotóxico nessa concentração. As concentrações químicas do teste devem ser selecionadas de modo a evitar a precipitação ou as soluções turvas.

19. Dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol (EtOH) são os solventes recomendados. Outros solventes de baixa citotoxicidade podem ser apropriados. Antes da utilização, todos os solventes devem ser avaliados quanto às propriedades específicas, por exemplo, reação com a substância química em teste, redução do efeito fototóxico, propriedades de remoção de radicais e/ou estabilidade química no solvente.

20. Mistura de vórtice e/ou ultrassom e/ou aquecimento a temperaturas apropriadas podem ser utilizados para auxiliar a solubilização, a menos que isso afete a estabilidade da substância química em teste.

Condições de irradiação

21. Fonte de luz: a escolha da fonte de luz e dos filtros apropriados é um fator crucial no teste de fototoxicidade. A luz dos UVA e das regiões visíveis está associada a reações fototóxicas *in vivo*[3,12], enquanto que o UVB é menos relevante, embora altamente citotóxico; a citotoxicidade aumenta 1.000 vezes à medida que o comprimento de onda vai de 313 a 280nm[13]. Os critérios para a escolha de fonte de luz apropriada devem incluir uma fonte de luz que emita comprimentos de onda absorvíveis pela substância química (espectro de absorção) e uma dose de luz (alcançável em tempo de exposição razoável) que seja suficiente para a detecção de substâncias químicas fotocitotóxicas. Entretanto, os comprimentos de onda e as doses empregadas não devem ser indevidamente prejudiciais ao sistema de teste, por exemplo, a emissão de calor (região do infravermelho).

22. Simuladores solares são considerados a melhor fonte de luz artificial. A distribuição de energia de irradiação do simulador solar filtrado deve ser próxima à da luz natural externa[14]. Ambos, arcos de xenônio e arcos de iodetos de mercúrio metálicos (dopados), são usados como simuladores solares[15]. Os últimos têm a vantagem de emitirem menos calor e serem mais baratos, mas a combinação com a luz solar é menos perfeita, comparada com a dos arcos de xenônio. Como todos os simuladores solares emitem quantidades significativas de UVB, eles devem ser adequadamente filtrados para atenuar os comprimentos de onda UVB altamente citotóxicos. Como os materiais plásticos da cultura de células contêm estabilizadores de UV, o espectro deve ser medido através do mesmo tipo de tampa de placa de 96 poços que será usado no ensaio. Independentemente das medidas tomadas para atenuar partes do espectro por filtragem ou por efeitos de filtro inevitáveis do equipamento, o espectro registrado abaixo desses filtros não deve se desviar da luz natural externa padronizada[14]. Um exemplo da distribuição de irradiância espectral do simulador solar filtrado usado no estudo de validação do teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU é dado em [8][16]. Veja também o anexo 3, Figura 1.

23. Dosimetria: a intensidade da luz (irradiância) deve ser verificada regularmente antes de cada ensaio de fototoxicidade, utilizando um medidor adequado de UV de banda larga. A intensidade deve ser medida através do mesmo tipo de tampa de 96 poços que será usado no ensaio. O medidor de UV deve ter sido calibrado para a fonte. O desempenho do medidor de UV deve ser verificado e, para este fim, o uso de um segundo medidor de UV de referência, do mesmo tipo e de calibração idêntica, é recomendado. Idealmente, em intervalos maiores, um espectro-radiômetro deve ser usado para medir a irradiância espectral da fonte de luz filtrada e verificar a calibração do medidor UV de banda larga.

24. Uma dose de 5J/cm^2 (medida na faixa de UVA) foi determinada como sendo não citotóxica para as células Balb/c 3T3 e suficientemente potente para excitar substâncias químicas para provocar reações fototóxicas[6,17], por exemplo, para atingir 5J/cm^2 dentro de um período de tempo de 50 minutos, a irradiância foi ajustada para 1,7mW/cm^2. Ver Figura 2 do anexo 3. Se for utilizada outra linhagem de células ou uma fonte de luz diferente, a dose de irradiação poderá ter que ser calibrada para que seja selecionado um regime de dose que não seja nocivo para as células, mas suficiente para estimular fototoxinas padrão. O tempo de exposição à luz é calculado da seguinte maneira:

$$1(min) = \frac{\text{dose de irradiação } (J/cm^2) \times 1/.000}{\text{irradiação } (nW/cm^2 \times 60)} \quad (1J = 1Wsec)$$

Condições de teste

Concentração da substância teste

25. Os intervalos de concentrações de uma substância química testada na presença (+Irr) e na ausência (-Irr) da luz devem ser adequadamente definidos em experiências de determinação da dose. Pode ser útil avaliar a solubilidade inicialmente e aos 60 minutos (ou qualquer tempo de tratamento a ser utilizado), pois a solubilidade pode mudar durante o tempo ou durante o curso da exposição. Para evitar toxicidade induzida por condições impróprias de cultivo ou por substâncias químicas altamente ácidas ou alcalinas, o pH das culturas de células com a substância química de teste adicionada deve estar na faixa de 6,5 a 7,8.

26. A concentração mais elevada da substância em estudo deve estar dentro das condições de teste fisiológico: por exemplo, osmótico e estresse do pH devem ser evitados. Dependendo do teste químico, pode ser necessário considerar outras propriedades físico-químicas como fatores que limitam a maior concentração de teste. Para substâncias relativamente insolúveis que não são tóxicas em concentrações até o ponto de saturação, a maior concentração alcançável deve ser testada. Em geral, a precipitação da substância química em teste em qualquer uma das concentrações do teste deve ser evitada. A concentração máxima de uma substância de ensaio não deve exceder 1.000μg/ml; a osmolalidade não deve exceder 10mmolar. Deve ser utilizada uma série de diluições geométricas de 8 concentrações da substância teste com um fator de diluição constante (ver parágrafo 47).

27. Se houver informação (a partir de uma experiência de pesquisa) que o teste químico não é citotóxico até a concentração limite no experimento na ausência de luz (-Irr), mas é altamente citotóxico quando irradiado (+Irr), as faixas de concentração a serem selecionadas para o experimento (+Irr) podem diferir daqueles selecionados para o experimento (-Irr), para se atender ao requisito de qualidade adequada de dados.

Controles

28. Sensibilidade à radiação das células, estabelecimento de dados históricos: as células devem ser verificadas regularmente (a cada cinco passagens) quanto

à sensibilidade à fonte de luz, avaliando sua viabilidade após a exposição a doses crescentes de irradiação. Várias doses de irradiação, incluindo níveis substancialmente maiores do que aqueles usados para o teste de fototoxicidade 3T3 NRU, devem ser usadas nesta avaliação. Estas doses são mais facilmente quantificadas por medições das partes UV da fonte de luz. As células são semeadas na densidade usada no teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU e irradiadas no dia seguinte. A viabilidade celular é determinada um dia depois, usando-se a absorção do Vermelho Neutro. Deve ser demonstrado que a maior dose não citotóxica resultante (por exemplo, no estudo de validação: 5J/cm^2 [UVA]) foi suficiente para classificar as substâncias químicas de referência corretamente (tabela 1).

29. Sensibilidade à radiação, checagem do teste atual: o ensaio satisfaz os critérios de qualidade se os controles negativos/solvente irradiado apresentarem viabilidade superior a 80%, quando comparados com o controle negativo/solvente não irradiado.

30. Viabilidade dos controles de solvente: a densidade óptica absoluta (OD540 NRU) do Vermelho Neutro extraído dos controles do solvente indica se as células 1x104 semeadas por poço cresceram com o tempo de duplicação normal durante os dois dias do ensaio. Um teste satisfaz os critérios de aceitação se a média de OD540 NRU dos controles não tratados for $\geq$0,4 (isto é, aproximadamente vinte vezes a absorção do solvente de fundo).

31. Controle positivo: uma substância química fototóxica conhecida deve ser testada simultaneamente com cada teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU. A clorpromazina (CPZ) é recomendada. Para o CPZ testado com o protocolo padrão no teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU, foram definidos os seguintes critérios de aceitação do teste: CPZ irradiado (+Irr): IC50 = 0,1 a 2,0μg/ml, CPZ não irradiado (-Irr): IC50 = 7,0 a 90,0μg/mL. O fator de irritação da foto (PIF) deve ser >6. O desempenho histórico do controle positivo deve ser monitorado.

32. Outras substâncias químicas fototóxicas, adequadas para a classe química ou características de solubilidade da substância a ser avaliada, podem ser usadas como controles positivos simultâneos no lugar da clorpromazina.

Procedimento de teste[6-8,16-7]:

1° dia:

33. Dispensar 100μL de meio de cultura nos poços periféricos de uma placa de mi-

crotitulação de cultura de tecidos de 96 poços (= brancos). Nos demais poços, dispensar 100µL de uma suspensão celular de 1x105 células/mL em meio de cultura (= 1x104 células/poço). Devem ser preparadas duas placas para cada série de concentrações individuais da substância teste, para o solvente e para os controles positivos.

34. Incubar as células por 24 horas (ver parágrafo 12) até formar uma monocamada meio confluente. Este período de incubação permite a recuperação de células, aderência e crescimento exponencial.

2° dia:

35. Após a incubação, decantar o meio de cultura das células e lavar delicadamente com 150µL da solução tamponada usada para incubação. Adicionar 100µl do tampão contendo a concentração apropriada de substância química ou solvente de teste (controle de solvente). Aplicar 8 concentrações diferentes da substância química em teste. Incubar as células com a substância teste no escuro durante 60 minutos (ver parágrafos 12 e 17).

36. Das duas placas preparadas para cada série de concentrações da substância em teste e dos controles, uma é selecionada aleatoriamente, para a determinação da citotoxicidade (-Irr) (isto é, a placa de controle) e uma (a placa de tratamento) para a determinação da fotocitotoxicidade (+Irr).

37. Para realizar a exposição +Irr, irradiar as células à temperatura ambiente por aproximadamente 50 minutos, através da tampa da placa de 96 poços com a maior dose de radiação que não é citotóxica (ver também o anexo 3). Manter as placas não irradiadas (-Irr) à temperatura ambiente, em uma caixa escura, por 50min (= tempo de exposição à luz).

38. Decantar a solução de teste e lavar cuidadosamente duas vezes com 150µl da solução tamponada usada para incubação, mas não contendo o material de teste. Substituir o tampão por meio de cultura e incubar (ver parágrafo 12) durante a noite (18-22 horas).

3° dia:

Avaliação microscópica

39. As células devem ser examinadas quanto ao crescimento, à morfologia e à integridade da monocamada usando-se um microscópio de contraste de fase.

Alterações na morfologia celular e efeitos no crescimento celular devem ser registrados.

Teste de absorção de vermelho neutro

40. Lavar as células com 150μL do tampão pré-aquecido. Remover a solução de lavagem com uma batida suave. Adicionar 100μL de 50μg/mL de Vermelho Neutro (NR) (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina, CAS número 553-24-2; IC 50040) em meio sem soro[16] e incubar como descrito no parágrafo 12, por 3 horas.

41. Após a incubação, remover o meio NR e lavar as células com 150μL do tampão. Decantar e remover o excesso de tampão por "blotting" ou centrifugação.

42. Adicionar exatamente 150μL NR de solução de dessorção (preparada recentemente com 49 partes de água + 50 partes de etanol + 1 parte de ácido acético).

43. Agitar a placa de microtitulação suavemente, em um agitador de placas de microtitulação, por 10 minutos até que a NR tenha sido extraída das células e tenha formado uma solução homogênea.

44. Medir a densidade óptica do extrato de NR a 540nm em um espectrofotômetro, usando espaços em branco como referência. Salvar dados em formato de arquivo eletrônico apropriado para análise subsequente.

DADOS E RELATÓRIOS

Qualidade e quantidade de dados

45. Os dados do teste devem permitir a análise significativa da concentração-resposta obtida na presença e na ausência de irradiação e, se possível, a concentração da substância química de teste pelo qual a viabilidade celular é reduzida para 50% (IC_{50}). Se a citotoxicidade for encontrada, tanto o intervalo de concentração como o intercepto de concentrações individuais devem ser ajustados, de modo a permitir o ajuste de uma curva aos dados experimentais.

46. Para ambos os resultados claramente positivos e negativos (ver parágrafo 53), a experiência primária, apoiada por uma ou mais experiências preliminares de determinação do intervalo de dose, pode ser suficiente.

47. Resultados ambíguos, limítrofes ou pouco claros devem ser esclarecidos por testes adicionais (ver também parágrafo 56). Em tais casos, a modificação de condições experimentais deve ser considerada. Condições experimentais que podem ser modificadas incluem o intervalo de concentração ou espaçamento, o tempo de pré-incubação e o tempo de exposição à irradiação. Tempo de exposição mais curto pode ser apropriado para substâncias químicas instáveis em água.

Avaliação de resultados

48. Para permitir a avaliação dos dados, o fator fotoirritante (PIF) ou o fotoefeito médio (MPE) pode ser calculado.

49. Para o cálculo das medidas de fotocitotoxicidade (ver abaixo), o conjunto de valores discretos de dose-resposta tem de ser aproximado por uma curva de dose-resposta contínua apropriada (modelo). O ajuste da curva aos dados é comumente realizado por um método de regressão não linear[18]. Para avaliar a influência da variabilidade dos dados na curva ajustada, recomenda-se um "procedimento de bootstrap".

50. Um fator fotoirritante (PIF) é calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$F = \frac{IC_{50}\ (-Irr)}{IC_{50}\ (+Irr)}$$

Se um IC50 na presença ou na ausência de luz não puder ser calculado, um PIF não pode ser determinado para o material teste.

51. O efeito fotográfico médio (EMA) baseia-se na comparação das curvas completas de resposta à concentração[19]. É definido como a média ponderada em um conjunto representativo de valores de efeito de foto:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i\ PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

O fotoefeito (PEc) em qualquer concentração (C) é definido como o produto do efeito de resposta (REc) e o efeito da dose (DEc); isto é: PEc = REc x DEc. O efeito de resposta (REc) é a diferença entre as respostas observadas na ausência e na presença de luz; isto é: REc = Rc (-Irr) - Rc (+Irr). O efeito da dose é dado por:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

Onde C* representa a concentração de equivalência, isto é, a concentração na qual a resposta +Irr é igual à resposta -Irr na concentração C. Se C* não pode ser determinado porque os valores de resposta da curva +Irr são sistematicamente maiores ou menores que RC (-Irr), o efeito da dose é definido como 1. Os fatores de ponderação wi são dados pelo maior valor de resposta, ou seja, wi = MAX {Ri (+Irr), Ri (-Irr)}. A grade de concentração Ci deve ser escolhida de tal modo que o mesmo número de pontos se enquadre em cada um dos intervalos de concentração, definidos pelos valores de concentração utilizados na experiência. O cálculo do MPE é restrito ao valor máximo de concentração em que, pelo menos, uma das duas curvas ainda exibe valor de resposta de, pelo menos, 10%. Se esta concentração máxima for maior do que a concentração mais alta usada na experiência +Irr, a parte residual da curva +Irr é ajustada para o valor de resposta "0". Dependendo se o valor de MPE é maior do que um valor de corte corretamente escolhido (MPEc = 0,15) ou não, a substância química é classificada como fototóxica.

52. Um pacote de softwares (programas) para cálculo do PIF e MPE está disponível[20].

Interpretação dos resultados

53. Baseando-se no estudo de validação[8], uma substância teste com PIF <2 ou um MPE <0,1 prevê "não fototoxicidade". Um PIF >2 e <5 ou um MPE >0,1 e <0,15 prevê "fototoxicidade provável" e um PIF >5 e um MPE >0,15 preveem "fototoxicidade".

54. Para qualquer laboratório que inicialmente estabelecer este ensaio, os materiais de referência listados na tabela 1 devem ser experimentados antes do teste de substâncias para fototoxicidade. Os valores de PIF ou MPE devem estar próximos dos valores mencionados na tabela 1.

TABELA 1

Substância Química	CASNR	PIF	MPE	Pico de absorção	Solvente[1]
Amiodarona HCL	19774-82-4	>3,25	0,27-0,54	242nm/ 300 nm (ombro)	Etanol
Cloridrato de Cloropromazina	69-09-0	>14,4	0,33-0,63	309nm	Etanol
Norfloxacina	70458-96-7	>71,6	0,34-0,90	316nm	Acetronitrilo
Antracina	120-12-7	>18,5	0,19-0,81	356nm	Acetronitrilo
Protoporfirina IX Dissódica	50865-01-5	>45,3	0,54-0,74	402nm	Etanol
L-histadina	7006-35-1	sem PIF	0,05-0,10	211nm	Água
Hexaclorofeno	70-30-4	1,1-1,7	0,00-0,05	299nm / 317nm (ombro)	Etanol
Lauril sulfato de sódio	151-21-3	1,0-1,9	0,00-0,05	Sem absorção	Água

Interpretação de dados

55. Se os efeitos fototóxicos forem observados apenas na concentração de teste mais alta (especialmente para substâncias químicas de teste solúveis em água), considerações adicionais podem ser necessárias para a avaliação do perigo – e podem incluir dados sobre a absorção da pele e a acumulação da substância química na pele e/ou dados de outros testes; por exemplo, testes da substância química em ensaios cutâneos animais ou humanos *in vitro* ou em modelos de pele.

56. Se não for demonstrada toxicidade (+Irr e -Irr) e se a fraca solubilidade limitar as concentrações que poderiam ser testadas, a compatibilidade da substância de teste com o ensaio pode ser questionada e o teste de confirmação deve ser considerado, utilizando-se outro modelo.

Relatório de teste

57. O relatório de teste deve incluir as seguintes informações:

Substância teste:

- Dados de identificação, nomes comuns genéricos e número IUPAC e CAS, se conhecidos
- Natureza física e pureza

- Propriedades físico-químicas relevantes para conduzir o estudo
- Espectro de absorção UV/vis
- Estabilidade e fotoestabilidade, se conhecidas

[1]*Solvente usado para medir absorção*

Solvente:

- Justificativa para a escolha do solvente
- Solubilidade da substância química teste no solvente
- Porcentagem de solvente presente no meio de tratamento

Células:

- Tipo e origem das células
- Falta do micoplasma
- Número de passagem da célula, se conhecido
- Sensibilidade das células à radiação, determinada com o equipamento de irradiação usado no teste de fototoxicidade *in vivo* 3T3 NRU

Condições de teste (1): incubação antes e depois do tratamento:

- Tipo e composição do meio de cultura
- Condições de incubação (concentração de CO_2, temperatura, umidade)
- Duração da incubação (pré-tratamento, pós-tratamento)

Condições de teste (2): tratamento com a substância química:

- Razão para a seleção de concentração da substância química teste usada na presença e na ausência de irradiação
- Em caso de solubilidade limitada da substância química teste e falta de citotoxicidade: razão para a concentração mais alta testada
- Tipo e composição do meio de tratamento (solução salina tamponada)
- Duração do tratamento químico

Condições de teste (3) (irradiação):

- Razão para a seleção de fonte de luz usada
- Fabricante e tipo da fonte de luz e radiômetro
- Características de irradiância espectral da fonte de luz
- Características de transmissão e absorção do(s) filtro(s) usado(s)
- Características do radiômetro e detalhes sobre sua calibração
- Distância da fonte de luz do sistema de teste
- Irradiância UVA a essa distância, expressa em mW/cm^2
- Duração da exposição à luz UV/vis
- Dose UVA (irradiância x tempo), expressa em J/cm^2
- Temperatura das culturas de célula durante irradiância e culturas de célula simultaneamente mantidas no escuro

Condições de teste (4) (teste de viabilidade do Vermelho Neutro):

- Composição do meio de tratamento do Vermelho Neutro
- Duração da incubação do Vermelho Neutro
- Condições de incubação (concentração de CO_2, temperatura, umidade)
- Condições de extração do Vermelho Neutro (agente de extração; duração)
- Comprimento de onda usado para leitura espectrofotométrica da densidade óptica do Vermelho Neutro
- Segundo comprimento de onda (referência), se usado
- Conteúdo do branco do espectrofotômetro, se usado

Resultados:

- Viabilidade celular obtida em cada concentração da substância química em estudo, expressa em percentual de viabilidade de controles de solvente concorrentes médios
- Curvas de resposta de concentração (concentração química de teste vs. viabilidade celular relativa) obtidas em experimentos simultâneos *+Irr* e *-Irr*
- Análise das curvas de concentração-resposta: se possível, computação/cálculo de IC50 (+Irr) e IC50 (-Irr)

- Comparação das duas curvas de resposta de concentração obtidas na presença e na ausência de irradiação, seja por cálculo do fator fotoinibição (PIF), seja pelo cálculo do fotoefeito médio (MPE)
- Critérios de aceitação do teste; controle de solvente simultâneo
- Viabilidade absoluta (densidade óptica do extrato Vermelho Neutro) de células irradiadas e não irradiadas
- Dados históricos de controle negativo e solvente; médias e desvios padrão
- Critérios de aceitação do teste; controle positivo simultâneo
- IC50 (+Irr) e IC50 (-Irr) e PIF/MPE da substância química de controle positivo
- Dados químicos de controle positivo histórico: IC50 (+Irr) e IC50 (-Irr) e PIF/MPE; médias e desvios padrão

Discussão dos resultados

Conclusões

LITERATURA

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme forin vitro screening of substances for photo allergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.

(2) Santamaria, L. andPrino, G. (1972). List of the photo dynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). in vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology". Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 "Guidance Document On Direct Photo transformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., andWillshaw, A. (1994). EEC/COLIPA projecton in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.

(7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., andBrantom, P. (1998). The international EU/COLIPA! Phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th – 31st October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available up on request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., andPuerner, J.A. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119-124.

(11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

(12) Lambert L.A, Wamer W.G., andKornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Actionspectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275.

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: in vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W.,De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union Directive 76/768/EEC in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340, en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

ANEXO 1

Definições

Irradiância: a intensidade da luz ultravioleta (UV) ou da luz visível incidente em uma superfície, medida em W/m^2 ou mW/cm^2.

Dose de luz: a quantidade (= intensidade x tempo) de radiação ultravioleta (UV) ou visível incidente em uma superfície, expressa em Joules (= W x s) por área de superfície; por exemplo, J/m^2 ou J/cm^2.

Bandas de luz UV: as designações recomendadas pela CIE (Comissão Internacional da L'Eclairage) são: UVA (315-400nm) UVB (280-315nm) e UVC (100-280nm). Outras designações também são usadas; a divisão entre UVB e UVA é frequentemente colocada a 320nm e o UVA pode ser dividido em UV-A1 e UV-A2, com uma divisão feita a cerca de 340nm.

Viabilidade da célula: parâmetro que mede a atividade total de uma população de células (por exemplo, absorção do corante vital Vermelho Neutro em lisossomos celulares) que, dependendo do desfecho medido e do desenho de teste utilizado, correlaciona-se com o número total e/ou a vitalidade das células.

Viabilidade relativa da célula: viabilidade celular expressa em relação aos controles do solvente (negativos) que foram tomados durante todo o procedimento de ensaio (+Irr ou -Irr), mas não tratados com a substância química em estudo.

PIF (Fator Fotoirritante): fator gerado pela comparação de duas concentrações citotóxicas igualmente eficazes (IC50) da substância química teste obtido na ausência (-Irr) e na presença (+Irr) de uma irradiação não citotóxica com luz UVA/vis.

IC50: a concentração de um químico teste para qual a viabilidade da célula é reduzida por 50%.

MPE (Fotoefeito Médio): medição derivada da análise matemática das curvas de resposta de concentração obtidas na ausência (-Irr) e na presença (+Irr) de uma irradiação não citotóxica de luz UVA/vis.

Fototoxicidade: resposta tóxica aguda que é provocada após a primeira exposição da pele a certas substâncias químicas e exposição subsequente à luz, ou que é induzida de forma semelhante pela irradiação da pele após a administração sistêmica de uma substância química.

ANEXO 2

Papel do PT 3T3 NRU em uma abordagem sequencial para o teste de fototoxicidade de produtos químicos:

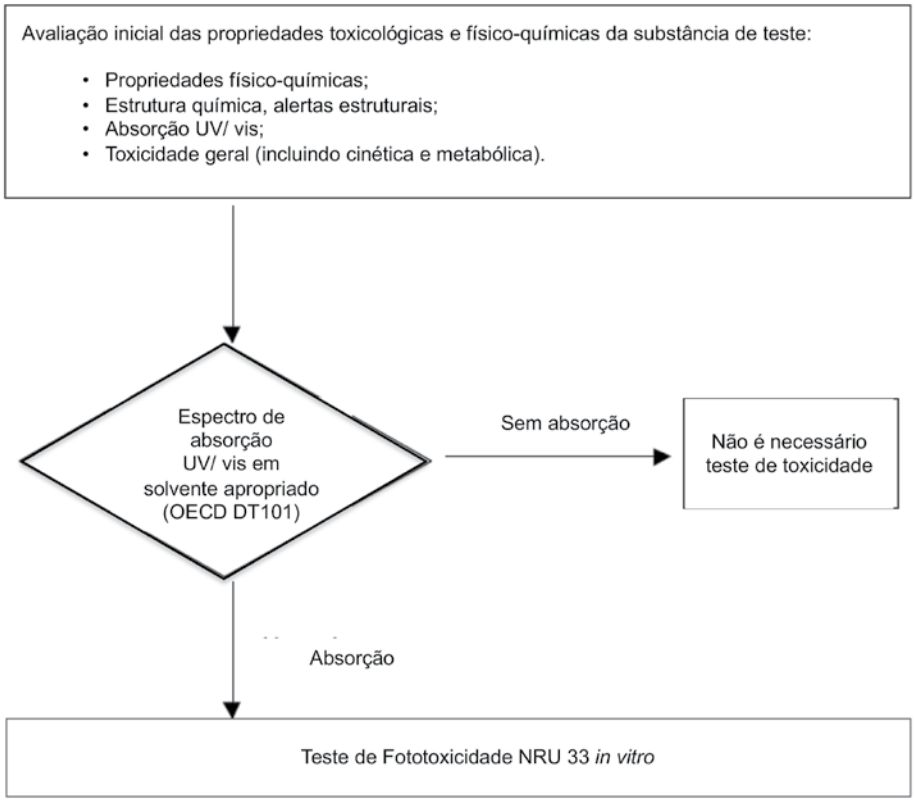
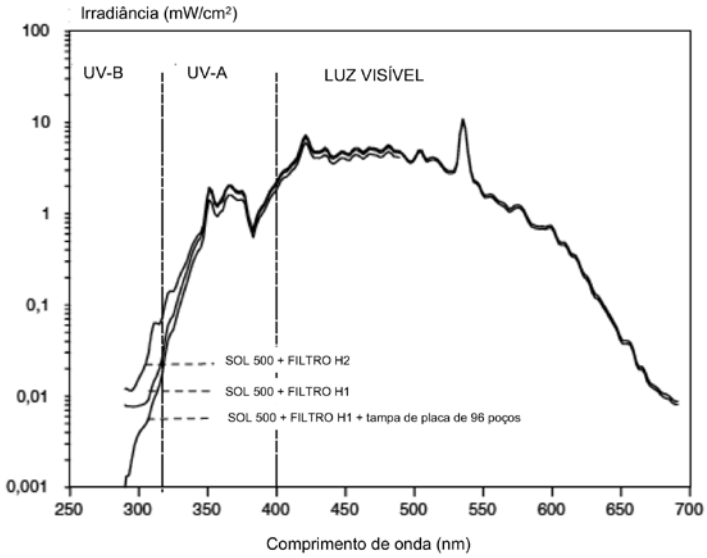


Figura 1: Distribuição do poder espectral de uma simulação solar filtrada

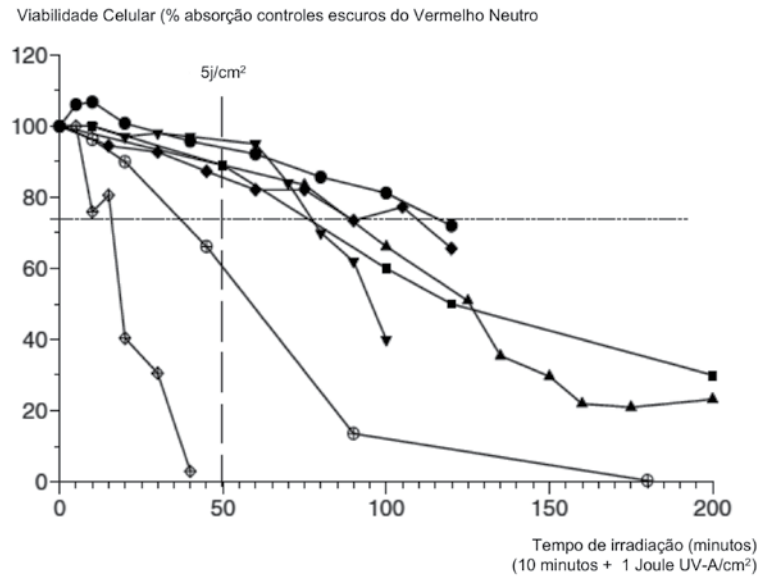


(Ver parágrafo 22)

A Figura 1 dá um exemplo de uma distribuição de energia espectral aceitável de um simulador solar filtrado. É da fonte de halogeneto de metal dopada utilizada no ensaio de validação do 3T3 NRU PT(6;8;17). O efeito de dois filtros diferentes e o efeito de filtragem adicional da tampa de uma placa de cultura de células de 96 poços são mostrados. O filtro H2 foi usado apenas com sistemas de teste que podem tolerar quantidade maior de UVB (teste de modelo de pele e teste de foto-hemólise de glóbulos vermelhos). No 3T3 NRU-PT, foi utilizado o filtro H1. A figura mostra que o efeito adicional de filtragem da tampa da placa é observado principalmente na faixa UVB, ainda deixando UVB suficiente no espectro de irradiação para excitar produtos químicos normalmente absorvidos na faixa de UVB, como a Amiodarona (ver tabela 1).

Figura 2: Sensibilidade da irradiação das células Balb/c 3T3 (medida na faixa de UV-A)

Figura 2: Sensibilidade da irradiação das células Balb/c 3T3 (medida na faixa de UV-A)



(Ver parágrafos 24, 28, 29)

Figura 2: Sensibilidade das células Balb/c 3T3 à irradiação com o simulador solar utilizado no ensaio de validação do teste de fototoxicidade 3T3NRU, medido na faixa de UVA. A figura mostra os resultados obtidos em 7 laboratórios diferentes no estudo de pré-validação(1). Enquanto as duas curvas com símbolos abertos foram obtidas com células envelhecidas (alto número de passagens), que tiveram que ser substituídas por novos estoques de células, as curvas com símbolos em negrito mostram células com tolerância à irradiação aceitável. A partir desses dados, a maior dose de irradiação não citotóxica de 5J/cm² foi derivada (linha tracejada vertical). A linha tracejada horizontal mostra, além disso, o efeito de irradiação máximo aceitável dado no parágrafo 29.

Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 428

Absorção cutânea: método in vitro

INTRODUÇÃO

1. Esta diretriz foi desenhada para fornecer informações sobre a absorção de uma substância de teste aplicada a uma amostra de tecido. Pode ser combinada com as Diretrizes OECD para absorção cutânea: método *in vivo*[1] ou conduzida separadamente. Recomenda-se que o Documento de Orientação OECD para a condução de estudos de absorção cutânea[2] seja consultado para auxiliar no desenho dos estudos baseados nesta Diretriz. O Documento de Orientação OECD foi preparado para facilitar a seleção de procedimentos *in vitro*, apropriados para uso em circunstâncias específicas e assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos por este método.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

2. Os métodos para medir a absorção cutânea e a resposta dermatológica podem ser divididos em duas categorias: *in vivo* e *in vitro*. Os métodos *in vivo* de absorção cutânea estão bem estabelecidos e fornecem informação farmacocinética em uma variedade de espécies animais. Os métodos *in vitro* são descritos em outra diretriz OECD[1]. Embora estudos de validação formal para os métodos *in vitro*, cobertos por esta Diretriz, não tenham sido realizados, peritos da OECD acordaram, em 1999, que já existem dados de avaliação suficientes para apoiar as Diretrizes *in vitro*[3]. Outros detalhes que comprovam esse suporte, incluindo número significativo de comparações diretas de métodos *in vitro* e *in vivo*, são fornecidos a partir do documento normativo que contempla os estudos acerca da absorção cutânea[2]. Existem várias monografias que analisam este tópico e fornecem informações detalhadas sobre o uso de um método *in vitro*[4-12]. Os métodos *in vitro* medem a propagação de substâncias químicas para o interior e através da pele até um reservatório de fluido e podem utilizar pele não viável, para medir a difusão de produtos químicos apenas, ou usar pele fresca, metabolicamente ativa, para simultaneamente medir difusão e metabolismo cutâneo. Tais métodos encontraram uso particular como triagem para comparar a dispersão de substâncias químicas dentro e através da pele a partir de diferentes formulações e podem, também, fornecer modelos úteis para a avaliação de absorção percutânea em humanos.

3. O método *in vitro* pode não ser aplicável em todas as situações e classes de substâncias químicas. É possível utilizar o método de teste *in vitro* para uma avaliação qualitativa inicial sobre a penetração da substância química na pele. Em certos casos, pode ser necessário acompanhar os dados *in vivo*. O Documento Normativo[2] deverá ser consultado para posterior elaboração de situações nas quais o método *in vitro* seja apropriado. Informação detalhada adicional para apoiar a decisão está disponível no relatório OECD de encontro de especialistas[3].

4. Essas diretrizes apresentam princípios gerais para medir a absorção e a difusão cutâneas de uma substância de teste, usando uma amostra de tecido cutâneo. A pele de muitas espécies de mamíferos, incluindo humanos, pode ser usada. As propriedades de permeabilidade da pele são mantidas após a biópsia do corpo, porque a principal barreira de difusão é o *stratum corneum* (extrato córneo) não viável; o transporte ativo de substâncias químicas através da pele ainda não foi identificado. O tecido epitelial apresentou capacidade de metabolizar algumas substâncias químicas durante a absorção percutânea[6], mas este processo não limita a dose absorvida de fato, embora possa afetar a natureza do material que penetra na corrente sanguínea.

PRINCÍPIOS DO TESTE

5. A substância de teste, que pode ser identificada a partir de um radioisótopo, é aplicada à amostra de pele, separando as duas câmaras de célula de difusão. A substância química permanece na pele por tempo específico, sob condições restritas, antes da remoção por procedimento de limpeza apropriado. O fluido receptor é analisado por amostras, em períodos ao longo do experimento, e analisado para o teste de substâncias químicas e/ou metabólitos.

6. Quando são utilizados sistemas metabolicamente ativos, os metabólitos da substância química de teste podem ser analisados por métodos apropriados. No final da experiência, a distribuição da substância química em estudo e dos seus metabólitos é quantificada, quando pertinente.

7. Usando condições adequadas, que são descritas nessa Diretriz, e acompanhando o documento normativo para estudos de absorção cutânea[2], a absorção de uma substância em estudo durante um determinado período é medida pela

análise do fluido receptor e do tecido cutâneo tratado. A substância de teste que permanece na pele deve ser considerada como absorvida, a menos que seja demonstrado que a absorção pode ser determinada somente a partir de valores do fluido receptor.

8. Para comprovar o desempenho e a confiabilidade do sistema de teste em um determinado laboratório, os resultados das substâncias químicas de referência relevantes devem estar disponíveis e de acordo com a literatura publicada para o método usado. Esta exigência pode ser atendida testando uma substância de referência adequada (preferencialmente de lipofilicidade próxima à da substância de teste), simultaneamente ao teste da substância ou fornecendo dados históricos adequados para várias substâncias de referência de diferentes lipofilicidades (por exemplo, cafeína, ácido benzoico e testosterona).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Célula de difusão

9. Uma célula de difusão consiste em uma câmara doadora e uma câmara receptora entre as quais a pele é posicionada (um exemplo do design típico é fornecido na Figura 1). A célula deve fornecer boa vedação ao redor da pele, permitir fácil amostragem e boa mistura da solução receptora, em contato com a parte inferior da pele, e bom controle de temperatura da célula e do seu conteúdo. Células de difusão estática ou de fluxo de passagem (respectivamente, em inglês “static” e “flow-through”) são aceitáveis. Normalmente, as câmaras doadoras não são fechadas durante a exposição a uma dose finita de uma preparação de teste. No entanto, para aplicações infinitas e certos cenários para doses finitas, as câmaras doadoras podem ser ocluídas.

Fluido receptor

10. O uso de fluido receptor fisiologicamente condutivo é preferido, embora outros possam também ser usados, desde que sejam justificados. A composição exata do fluido receptor deve ser fornecida. A solubilidade adequada da substância química de teste no fluido receptor deve ser demonstrada para que não atue como uma barreira à absorção. Além disso, o fluido receptor não deve afetar a integridade da preparação da pele. Em um sistema de fluxo de passagem (flow-through), a taxa de fluxo não deve impedir a difusão de uma substância de

teste no fluido receptor. Em um sistema de células estáticas, o fluido deve ser continuamente agitado e amostrado regularmente. Se o metabolismo estiver sendo estudado, o fluido receptor deve suportar a viabilidade da amostra de tecido cutâneo durante todo o experimento.

Preparação da pele

11. Peles de origem animal e humana podem ser usadas. É reconhecido que o uso de pele humana é assunto de considerações e condições de ética nacionais e internacionais. Embora pele viável seja preferível, pele não viável pode ser usada, desde que a sua integridade possa ser demonstrada. Tanto membranas epidérmicas (separadas por calor, enzimática ou quimicamente), quanto pele de espessura dividida (tipicamente, com espessura de 200-400μm) preparada com dermátomo, são aceitas. A espessura total da pele pode ser usada, mas a espessura excessiva (ca. >1 mm) deve ser evitada, a menos que seja especificamente necessário para a determinação da substância química de teste nas camadas da pele. A seleção de espécies, de localização anatômica e de técnica preparativa devem ser justificadas. Dados aceitáveis de, no mínimo, quatro repetições por preparação de teste são necessários.

Integridade da preparação da pele

12. É essencial que a pele seja tratada de maneira apropriada. O manuseio inadequado pode resultar em danos ao extrato córneo, dado que a integridade da pele preparada deve ser verificada. Quando o metabolismo da pele está sendo investigado, a amostra cutânea recém-coletada deve ser usada o mais rápido possível e sob condições conhecidas para suportar a atividade metabólica. Como orientação geral, a pele recentemente removida deve ser usada dentro de 24 horas, mas o período de armazenamento aceitável pode variar, dependendo do sistema enzimático envolvido, nas temperaturas de metabolização e armazenamento[13]. Quando as preparações de pele tiverem sido armazenadas antes do uso, devem ser apresentadas evidências para mostrar que a função de barreira está mantida.

Substância de teste

13. A substância de teste é a essência cujas características de penetração serão estudadas. Idealmente, a substância de teste deve ser identificada a partir de um radioisótopo.

Preparação do teste

14. A preparação da substância de teste (por exemplo, material puro, diluído ou formulado contendo a substância de teste que é aplicada na pele) deve ser a mesma (ou um substituto realista) daquela à que os seres humanos ou outras potenciais espécies-alvo possam ser expostos. Qualquer variação da preparação "em uso" deve ser justificada.

Concentração e formulação da substância teste

15. Normalmente, mais de uma concentração da substância teste é usada em formulações típicas, abrangendo a faixa realista de potenciais exposições humanas. Da mesma forma, testar uma gama de formulações típicas deve ser considerada.

Aplicação na pele

16. Em condições normais de exposição humana a substâncias químicas, doses finitas são geralmente encontradas. Portanto, aplicações que imitem a exposição humana, normalmente 1-5mg/cm^2 de pele, para sólidos, e até 10μl/cm^2, para líquidos, devem ser usadas. A quantidade deve ser justificada pelas condições de uso esperadas, pelos objetivos do estudo ou pelas características físicas da preparação do teste. Por exemplo, aplicações na superfície da pele podem ser infinitas, onde grandes volumes por unidade de área são aplicados.

Temperatura

17. A difusão passiva de substâncias químicas (e, portanto, a absorção pela pele) é afetada pela temperatura. A câmara de difusão e a pele devem ser mantidas em temperatura constante, próxima à temperatura normal da pele, de 32 $\pm$ 1°C. Diferentes designs de células exigirão diferentes temperaturas de banho de água ou bloco aquecido para garantir que o receptor/pele esteja em sua norma fisiológica. A umidade deve preferencialmente estar entre 30% e 70%.

Duração da exposição e amostragem

18. A exposição da pele à preparação de teste pode se dar por toda a duração da experiência ou por períodos mais curtos (isto é, para imitar um tipo específico de exposição humana). A pele deve ser lavada, para retirar o excesso de preparação de teste, com um agente de limpeza relevante; o que for enxaguado deve ser coletado para análise. O procedimento de remoção da preparação do teste

dependerá da condição de uso esperada e deve ser justificado. Normalmente, é necessário um período de amostragem de 24 horas para permitir a caracterização adequada do perfil de absorção. Como a integridade da pele pode começar a se deteriorar além das 24 horas, o período de amostragem não deve exceder 24 horas. Para substâncias de teste que penetrem rapidamente na pele, isso pode não ser necessário, mas, para substâncias de teste que penetrem lentamente, períodos mais longos podem ser necessários. A frequência de amostragem do fluido receptor deve permitir que o perfil de absorção da substância de teste seja apresentado graficamente.

Procedimentos terminais

19. Todos os componentes do sistema de teste devem ser analisados e a recuperação deve ser determinada. Isto inclui a câmara doadora, o enxágue da superfície da pele, a preparação da pele e o fluido/câmara receptora. Em alguns casos, a pele pode ser fracionada, entre a área exposta e área sob a flange celular e entre as frações do extrato córneo, da epiderme e da derme, para análise em separado.

Análise

20. Em todos os estudos, a recuperação adequada deve ser feita (o ideal dever ser uma média de 100±10% da radioatividade e qualquer desvio deve ser justificado). A quantidade da substância teste no fluido receptor, na preparação da pele, na lavagem da superfície da pele e no enxágue de aparelhos deve ser analisada, usando uma técnica adequada.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

21. A análise do fluido receptor, a distribuição da substância química de teste no sistema e o perfil de absorção com o tempo devem ser apresentados. Quando são usadas condições de exposição a doses finitas, a quantidade lavada da pele, a quantidade associada à pele (e nas diferentes camadas da pele, se analisadas) e a quantidade presente no fluido receptor (taxa e quantidade ou porcentagem da dose aplicada) devem ser calculadas. A absorção pela pele pode, algumas vezes, ser expressa usando-se apenas dados do fluido receptor. No entanto, quando a substância em estudo permanece na pele no final do estudo,

poderá ser necessário incluir esta quantidade no montante total absorvido (ver Documento de Orientação, parágrafo 66). Quando são utilizadas condições de exposição a doses infinitas, os dados podem permitir o cálculo de uma constante de permeabilidade (Kp). Sob as últimas condições, a porcentagem absorvida não é relevante.

Relatório do teste

22. O relatório de teste deve incluir os requerimentos estipulados no protocolo, incluindo a justificativa para o sistema de teste usado e deve abranger os seguintes tópicos:

- Substância teste:
  - o Natureza física, propriedades físico-químicas (ao menos o peso molecular e log Pow), pureza (pureza radio-química);
  - o Informações de identificação (número de lote, por exemplo);
  - o Solubilidade no fluido receptor.
- Preparação do teste:
  - o Formulação e justificativa de uso;
  - o Homogeneidade.
- Condições do teste:
  - o Fonte e sítio da pele, método de preparação, condições de armazenamento antes do uso, qualquer pré-tratamento (limpeza, tratamentos antibióticos, etc.), medidas de integridade da pele, estado metabólico, justificativa de uso;
  - o Design da célula, composição do fluido receptor, taxa de fluxo do fluido receptor ou tempo de amostragem e procedimentos;
  - o Detalhes da aplicação do teste de preparação e quantificação da dose aplicada;
  - o Duração da exposição;
  - o Detalhes da remoção da preparação da pele, por exemplo, enxágue;
  - o Detalhes da análise da pele e de qualquer técnica de fracionamento aplicada para demonstrar distribuição da pele;
  - o Procedimento de lavagem das células e dos equipamentos;

- Métodos de ensaio, técnicas de extração, limites de detecção e validação do método analítico.

• Resultados:

- Recuperações gerais do experimento (dose aplicada = lavagens da pele + pele + fluido receptor + lavagens da célula);
- Tabulação de recuperações das células individuais em cada compartimento;
- Perfil de absorção;
- Dados de absorção tabulados (expressos como taxa, quantidade ou porcentagem).

• Discussão de resultados.

• Conclusão.

LITERATURA

(1) OECD (2004). Test Guideline 427: Skin absorption: in vivo Method. OECD, Paris.

(2) OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Studies, in In vitro Percutaneous Absorption: Principles Fundamentals and Applications, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

(6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). In vitro percutaneous absorption: Principles Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton.

(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M,Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for In vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, FdChemTox, 37, 191-205.

(9) Recommended Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

(10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR et al. (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

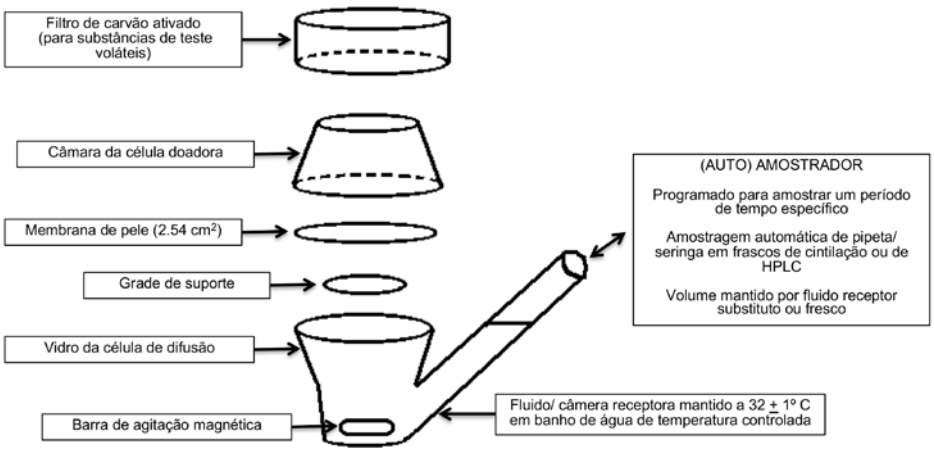
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Exemplo de um design típico de uma célula de difusão estática para estudos de absorção percutânea *in vitro*.



ANEXO

Definições

Dose não absorvida: representa aquela lavada da superfície da pele após exposição e qualquer uma presente na cobertura não oclusiva, incluindo qualquer dose que se mostre volatilizável da pele durante a exposição.

Dose absorvida (in vitro): massa da substância de teste alcançando o fluido receptor ou circulação sistêmica em um período específico.

A dose absorvível (in vitro): representa aquela presente sobre ou dentro da pele após a lavagem.

Adotado: 20 de Julho de 2018

Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 129

Direção do meio ambiente
Reunião conjunta do comitê químico e do grupo de trabalho em substâncias químicas, pesticidas e biotecnologia

Série em teste e avaliação nº 129

Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda

PREFÁCIO

Este documento apresenta a orientação preliminar da OECD sobre "Uso de Testes de Citotoxicidade para Estimar Doses Iniciais para Testes Agudos de Toxicidade Sistêmica Oral". O projeto para desenvolver este documento de orientação foi proposto pelos Estados Unidos. Os comentários, sobre o primeiro rascunho, foram solicitados ao Grupo de Trabalho de Coordenadores Nacionais do Programa de Diretrizes para Testes (WNT, em inglês) em junho de 2009. Um rascunho revisado foi aprovado na reunião do WNT, realizada em 23-25 de março de 2010. Na Reunião Conjunta do Comitê de Substâncias Químicas e do Grupo de Trabalho sobre Substâncias Químicas, Pesticidas e Biotecnologia, concordou-se com a sua desclassificação em 19 de julho de 2010.

Este documento é publicado sob a responsabilidade da reunião conjunta do Comitê de Substâncias Químicas e do Grupo de Trabalho sobre Substâncias Químicas, Pesticidas e Biotecnologia.

PREÂMBULO

1. Vários projetos nacionais e internacionais estabeleceram relação entre a citotoxicidade *in vitro* e a letalidade aguda *in vivo*. O Programa de Avaliação Multicêntrica da Citotoxicidade In Vitro (MEIC, em inglês), estabelecido em 1989 pela Sociedade Escandinava de Toxicologia Celular, investigou a capacidade dos métodos de teste de citotoxicidade *in vitro* em predizer letalidade oral aguda em humanos usando 50 substâncias de referência. O programa MEIC baseou-se na hipótese de que a citotoxicidade basal, detectada pelos métodos de ensaio

in vitro, é responsável por grande proporção de efeitos tóxicos *in vivo* e que, portanto, sistemas *in vitro* de cultura celular poderiam ser utilizados para modelar a toxicidade oral aguda *in vivo*.

2. Outra iniciativa nacional, a base de dados do Registro de Citotoxicidade (RC), montada pelo Centro Alemão de Documentação e Avaliação de Alternativas para Experiências Animais (ZEBET, em inglês), no Instituto Federal de Avaliação de Risco (BfR, em alemão), contém valores de DL_{50} orais agudos de roedores e valores de IC_{50} de vários ensaios de citotoxicidade *in vitro*, para o total de 347 substâncias. Foi desenvolvido um modelo de regressão linear utilizando os valores de IC_{50}, transformados em logaritmo, e os valores de DL_{50} oral de roedores, transformados em log, para a previsão de valores de DL_{50} orais agudos a partir dos valores de IC_{50}.

3. Os dados do MEIC e do BfR-ZEBET também foram considerados num work shop de 1996, em que a utilização de dados de citotoxicidade *in vitro*, para determinar as doses iniciais dos testes de toxicidade oral aguda em roedores e, subsequentemente, diminuir o número de animais utilizados, foi discutida, como forma de reduzir a utilização de animais para a classificação e a rotulagem de substâncias químicas.

4. O conceito de utilização de dados de citotoxicidade *in vitro* para determinar as doses iniciais dos testes de toxicidade oral aguda em roedores foi discutido e avaliado no Workshop Internacional sobre Métodos *In Vitro* para Avaliação da Toxicidade Sistêmica Aguda, organizado pelo Comitê de Coordenação Interinstitucional para a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM) e patrocinado pelo Programa Nacional de Toxicologia dos EUA (NTP), pelo Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental dos EUA (NIEHS) e pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), tendo sido realizado em Arlington, EUA, em outubro de 2000. O comitê recomendou que o método deva ser melhor avaliado.

5. O Centro NTP de Avaliação de Métodos Alternativos Toxicológicos (NICEATM) colaborou com o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), um componente do Centro Comum de Pesquisa da Comissão Europeia, para caracterizar ainda mais a utilidade de ensaios de citotoxicidade *in vitro*, como preditores de doses iniciais para ensaios agudos de letalidade oral. O NICEATM e o ECVAM desenvolveram um estudo de validação multilaboratorial, para avaliar o

desempenho de dois métodos padronizados de testes de citotoxicidade basal *in vitro*, utilizando 72 substâncias de referência com dados *in vivo* de alta qualidade. Com base nos resultados do estudo, o ICCVAM e o ECVAM recomendaram que o modelo de regressão RC, usando um valor IC_{50} de um teste de citotoxicidade basal *in vitro*, pudesse ser usado para prever um valor de DL_{50} para uso como uma dose inicial para a Classe Tóxica Aguda (ATC) (DT 423) ou o Procedimento de Teste Up-and-Down (UDP) (DT 425). Simulações, para as substâncias de referência, mostraram que a utilização de ensaios de citotoxicidade *in vitro*, para estimar uma DL_{50} como dose inicial, poderia reduzir potencialmente o uso de animais em até 28%, para testes de toxicidade oral aguda, e até 50%, para substâncias não classificadas.

INTRODUÇÃO

6. O conceito de utilização de dados de citotoxicidade *in vitro*, para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade oral aguda em roedores, foi discutido e avaliado no Workshop Internacional sobre Métodos *In Vitro* para Avaliação da Toxicidade Sistêmica Aguda, realizado em 2000 (ICCVAM, 2001a). A abordagem envolve a utilização de um valor de IC_{50} de um teste de citotoxicidade basal *in vitro* com a regressão do Registro de Citotoxicidade (RC) para prever um valor de DL_{50} para utilização como uma dose inicial para o método de Classe Tóxica Aguda (ATC) ou para o procedimento de teste Up-and-Down (UDP) (Spielmann et al., 1999). Simulações mostraram que o uso de ensaios de citotoxicidade in vitro, para estimar um DL*50* para uso como uma dose inicial no UDP, poderia reduzir potencialmente o uso de animais em 25-40% (Spielmann et al., 1999; ICCVAM, 2001a).

7. Para investigar a utilidade e as limitações dos testes de citotoxicidade padronizados para calcular as doses a partir de testes de toxicidade oral aguda, o Programa Nacional de Toxicologia (NTP, em inglês: National Toxicology Program), do Centro Interinstitucional para a Avaliação dos Métodos Toxicológicos Alternativos (NICEATM), e o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos [ECVAM] patrocinaram e organizaram um estudo de validação internacional usando 72 substâncias codificadas, testadas em três laboratórios (ICCVAM, 2006a). BAL/c 3T3 de fibroblastos de camundongo (3T3) e queratinócitos epidérmicos humanos normais (NHK) foram selecionados e a absorção de vermelho neutro (NRU) foi utilizada como o ponto final de citotoxicidade no estudo de validação NICEATM-ECVAM. Isso foi consistente com as recomendações incluídas no documento de orientação inicial da ICCVAM (ICCVAM, 2001b) para essa finalidade,

que foram baseadas em resultados reprodutíveis para ambos os métodos de teste em esforços anteriores de validação (ICCVAM, 2001b). Com base nos resultados do estudo de validação do NICEATM-ECVAM, esses métodos de teste são agora recomendados para consideração de rotina, antes de usar camundongos para estudos de toxicidade aguda pelas agências reguladoras e de saúde pública dos EUA (ICCVAM, 2006c)[1].

[1]*Consulte http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_recommend.htm para obter respostas das agências dos EUA às recomendações da ICCVAM.*

Quando apropriado e usado para estimar as doses iniciais, o uso de animais pode ser reduzido para cada estudo em até 50% (ICCVAM, 2006a, b). Essas recomendações são consistentes com as conclusões de um painel internacional independente de revisão por pares, que concluiu que os métodos eram adequadamente confiáveis e reprodutíveis para uso em uma abordagem baseada em evidência para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade oral aguda (ICCVAM, 2006b).

As definições utilizadas no contexto da presente orientação figuram no anexo 1.

8. Grande número de projetos nacionais e internacionais estabeleceu a relação inicial entre a citotoxicidade *in vitro* e a letalidade *in vivo*. O Programa de Avaliação Multicentro da Citotoxicidade *in vitro* (MEIC), estabelecido em 1989, pela Sociedade Escandinava para Toxicologia Celular, investigou a capacidade de métodos *in vitro* de ensaio de citotoxicidade (utilizando 50 substâncias de referência) para prever a letalidade aguda oral em seres humanos (Bondesson *et al.*, 1989). O programa MEIC baseou-se na hipótese de que a citotoxicidade basal, detectada pelos métodos de ensaio *in vitro*, é responsável por grande proporção de efeitos tóxicos *in vivo* e que, portanto, sistemas *in vitro* de cultura celular poderiam ser utilizados para modelar a toxicidade oral aguda *in vivo*. A base mecanicista das semelhanças entre morte animal e morte celular é que todas as células, independentemente de estarem em animais ou em culturas celulares *in vitro*, possuem mecanismos celulares semelhantes; por exemplo, produção de energia e manutenção da integridade da membrana celular. A capacidade dos dados IC_{50} *in vitro* do MEIC para prever a letalidade oral aguda humana foi avaliada, utilizando concentrações letais (CL) de sangue/soro humano, compiladas de três diferentes conjuntos de dados: 1) valores de CL aguda medidos clinicamente; 2) valores agudos de CL mensuradas post-mortem; e 3) valores máximos de CL derivadas de curvas aproximadas de CL_{50} ao longo do tempo após a exposição. Uma aná-

lise preliminar de mínimos quadrados indicou que os dados de IC_{50} gerados em até 61 métodos de teste previram os três conjuntos de dados de CL, bem como coeficientes de determinação (R2) de 0,77, 0,76 e 0,83 (Ekwall *et al.*, 2000).

9. Outra iniciativa nacional, a base de dados RC montada pelo ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz - und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch – Centro Alemão de Documentação e Avaliação de Métodos Alternativos a Experiências Animais), contém valores de DL_{50} orais agudos de roedores do Registro de Efeitos Tóxicos para Substâncias Químicas (RTECS®, Symyx Technologies, Inc., Sunnyvale, Califórnia, EUA. – http://www.symyx.com/products/databases/bioactivity/rtecs/index.jsp) e valores IC_{50} publicados de vários ensaios de citotoxicidade in vitro para 347 substâncias (Halle, 1998; 2003). Halle (1998, 2003) calculou uma regressão linear usando os valores de IC_{50}, transformados em log (em mM), e DL_{50} oral de roedores, transformados em log (em mmol/kg), para desenvolver um modelo para a predição de valores de DL_{50} orais ($R^2=0,45$; $p<0,001$ para inclinação). O intervalo de previsão aceitável para DL_{50} foi empiricamente definido, por Halle (1998, 2003), como aproximadamente metade de uma ordem de magnitude em ambos os lados da regressão linear de melhor ajuste (ou seja, $\pm$ log 5 ou $\pm$0,699). Este intervalo foi baseado em oito regressões lineares publicadas, calculadas utilizando-se valores de IC_{50} de citotoxicidade de células de mamífero in vitro de vários pontos de término tóxicos em aproximadamente oito ordens de grandeza e valores orais de DL_{50} de camundongo ou rato. Setenta e três por cento (252/347) das substâncias RC estão dentro do intervalo de previsão.

10. Os dados de MEIC e ZEBET foram também considerados num seminário em 1996, quando a utilização de dados de citotoxicidade *in vitro*, para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade oral aguda em roedores e, subsequentemente, diminuir o número de animais utilizados, foi discutida como uma forma de reduzir o uso de animais para a classificação e a rotulagem de substâncias químicas (Seibert *et al.*, 1996).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Informação de contexto

11. O procedimento de ensaio de citotoxicidade basal in vitro da NRU baseia-se na capacidade das células viáveis em incorporar e ligar-se ao vermelho neutro (VN), um corante supravital (Borenfreund e Puerner, 1985). O VN é um corante

catiônico fraco, que se difunde rapidamente, através da membrana plasmática, e se concentra nos lisossomos, onde se liga eletrostaticamente à matriz lisossomal aniônica. Substâncias tóxicas podem alterar a superfície celular ou a membrana lisossômica para causar fragilidade lisossomal e outras alterações adversas que, gradualmente, se tornam irreversíveis. Tais alterações adversas provocam a morte celular e/ou a inibição do crescimento celular, que diminuem a quantidade de VN retida pela cultura. Uma vez que a concentração de corante VN adsorvido das células cultivadas é diretamente proporcional ao número de células vivas, a citotoxicidade é expressa como uma redução dependente da concentração da captação de VN após exposição a substâncias químicas. O ensaio NRU usa um formato de placa de 96 poços para a produção de medições, replicadas em oito concentrações de substâncias de teste.

12. Os dados dos testes *in vitro* podem ser usados para estimar a dose inicial de testes agudos de toxicidade sistêmica oral.

A dose inicial *in vivo* é um valor estimado de DL_{50}, calculado inserindo-se o valor de IC_{50} *in vitro* numa fórmula de regressão derivada de 282 substâncias, para as quais existem valores históricos de DL_{50} orais de camundongos e valores IC_{50} *in vitro* do RC (ICCVAM, 2006a). Para as 72 substâncias químicas testadas no estudo de validação de citotoxicidade basal in vitro do NICEATM/ECVAM, a reprodutibilidade interlaboratorial da IC_{50}, medida pelo coeficiente de variação médio (CV), foi de 47%, para o ensaio 3T3 NRU, e 28%, para o NHK ensaio NRU. Testes de toxicidade sistêmica oral aguda, simulada por computador, das substâncias em teste, indicaram que a economia animal, que foi calculada comparando-se o número de animais usados, com a dose inicial determinada pela NRU, com o número de animais usados com a dose inicial padrão, foi semelhante usando-se os testes 3T3 ou o NHK NRU para determinar as doses iniciais (ICCVAM, 2006a). Os métodos de estudo de validação do NICEATM-ECVAM (ICCVAM, 2006a, b, c) demonstraram que os dois métodos de teste são úteis e reprodutíveis para este propósito. A similaridade da economia de animais para os testes 3T3 e NHK NRU deve-se à similaridade geral dos valores de IC_{50} produzidos (isto é, 85% [61/72], das substâncias testadas no estudo de validação NICEATM-ECVAM apresentaram valores de 3T3 e NHK NRU IC50 dentro de uma ordem de magnitude (ICCVAM, 2006a) e a minimização de diferenças usando uma equação de regressão de log para predizer DL_{50}.

13. A economia de animais é maior para substâncias químicas com DL_{50} >5.000mg/kg. A economia de animais de até 50% é possível usando-se a abordagem de citotoxicidade para uma dose inicial, em comparação com o número de animais usados com a dose inicial padrão na UDP (OECD, 2008). Isto pode ser conseguido se o teste de citotoxicidade for realizado primeiro e os dados *in vitro* predizerem a DL_{50} >5.000mg/kg. O UDP continuaria com uma dose inicial de 5.000mg/kg, em vez da dose inicial padrão de 175mg/kg; assim, três animais seriam usados, em vez de seis, para determinar o DL_{50} (ICCVAM, 2009). Para substâncias químicas com DL_{50} >5.000mg/kg, o uso médio de animais para o UDP foi reduzido em até 22% por teste e o uso médio de animais pelo método ATC (OECD, 2001a) foi reduzido em até 28% por teste. Uma revisão dos valores de toxicidade na União Europeia revela que a maioria das substâncias industriais testadas para fins regulatórios tem DL_{50} >2.000mg/kg. Oitenta e sete por cento das substâncias químicas da Base de Dados de Novas Substâncias Químicas, mantida no Instituto de Saúde e Defesa do Consumidor (IHCP, DG-JRC, Ispra [http://ecb.jrc.it]), têm DL_{50} >2.000mg/kg (Bulgheroni *et al.*, 2009). Embora a economia de animais para o Procedimento de Dose Fixa (FDP; OECD, 2001b) não tenha sido avaliada durante o estudo de validação do NICEATM-ECVAM, os mesmos princípios se aplicariam.

Limitações

14. As limitações dos métodos de NRU *in vitro* são, em grande parte, devido às diferenças entre os sistemas de animais inteiros e de cultura de células. Os sistemas de cultura de animais e células são diferentes em relação a como uma substância ou um agente tóxico é entregue à célula e como ela é distribuída dentro da célula, metabolizada e excretada. Após a administração oral, os animais devem absorver o agente tóxico pelo trato gastrointestinal. O agente tóxico pode ou não estar ligado às proteínas séricas, o que reduziria sua disponibilidade para o órgão-alvo. O agente tóxico pode ser metabolizado antes, durante e/ou após a sua distribuição aos órgãos-alvo, ou o agente tóxico ou os seus metabólitos podem ser excretados antes de atingir o órgão-alvo. Como consequência, os órgãos-alvo mais críticos podem não ser expostos ao metabólito ativo, ou serem expostos apenas por tempo limitado ou a uma fração relativamente pequena da dose administrada.

15. Em contraste, em um sistema de cultura de células, a substância de teste é aplicada diretamente nas células-alvo e as únicas membranas que devem ser

atravessadas são aquelas da célula-alvo e suas organelas subcelulares. Os sistemas de cultura de células podem ou não incluir proteínas séricas, o que poderia reduzir a disponibilidade de substâncias tóxicas para o local-alvo. Células 3T3 e NHK têm pouca ou nenhuma capacidade de metabolizar compostos xenobióticos. Qualquer coisa excretada da célula permanece no meio de cultura e está disponível para as outras células da cultura. Como resultado, as células em cultura (em oposição às células de um animal) podem ser expostas a uma substância de teste durante toda a duração do protocolo de teste. Os animais e os sistemas de cultura de células também podem diferir em relação ao alvo em que atua um agente tóxico. Se um agente tóxico age in vivo em um sistema especializado, ele pode não produzir um efeito tóxico pelo mesmo mecanismo em células cultivadas que são derivadas de um tecido diferente do órgão-alvo. Por exemplo, não seria de se esperar que uma substância que afete uma via mediada por neurorreceptores, em animais, produzisse toxicidade semelhante em células 3T3 ou NHK; se a toxicidade for observada nessas culturas de células, pode ser de um mecanismo diferente ou em uma relação de concentração diferente do que *in vivo*.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

16. O presente Documento de Orientação descreve métodos para determinar a citotoxicidade basal *in vitro* de substâncias de teste utilizando ensaios de NRU e a utilização de dados *in vitro* para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral *in vivo*. O ensaio NRU é realizado num formato dose-resposta para determinar a concentração que reduz a NRU em 50% em comparação com os controles (IC_{50}).

O valor de IC_{50} é usado em uma equação de regressão linear para estimar o valor de DL_{50} oral (dose que produz letalidade em 50% dos animais testados), que é então usada para determinar uma dose inicial para teste de toxicidade sistêmica oral aguda usando ratos para o UDP, o método ATC ou o FDP. O uso do método de teste NRU em uma abordagem baseada em evidência, para determinar as doses iniciais para estes testes agudos de toxicidade sistêmica oral, pode diminuir o número de animais necessários para os testes e, para substâncias relativamente tóxicas, pode reduzir o número de animais que morrem ou necessitam de eutanásia, devido à toxicidade grave. Para estimar as doses iniciais, os dados in vitro devem ser considerados juntamente com todos os outros dados e informações, tais como: as previsões da relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR), a DL_{50}

de substâncias relacionadas e outros dados existentes, para estimar uma dose que seja próxima ao valor DL_{50} real.

17. Protocolos padronizados de métodos de teste (Stokes *et al.*, 2008) fornecem detalhes para a realização de testes NRU com células de roedores ou humanas. O ensaio de citotoxicidade basal *in vitro* da NRU envolve a exposição de células em cultura a uma substância de teste durante 48 horas. A substância de teste é lavada e as células são então incubadas com corante VN. A concentração de corante VN eluído das células é então quantificada espectrofotometricamente. Stokes *et al*. (2008) descrevem os métodos para testar substâncias usando a linha celular imortalizada de roedores, 3T3, e células humanas primárias, NHK, no ensaio NRU. Os resultados para os dois tipos de células mostraram-se semelhantes no estudo de validação; entretanto, o ensaio 3T3 NRU é mais eficaz em termos de tempo e custo do que o ensaio NHK NRU. Métodos para preparação e diluição de substâncias a serem testadas nos métodos *in vitro* NRU são também descritos, juntamente com um procedimento de solubilidade em camadas, para determinar o melhor solvente para testar a substância de interesse. Como o ensaio NHK NRU requer atenção especial em relação ao meio de cultura de células, um procedimento de pré-qualificação médio é fornecido (anexo 2).

DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS DE ENSAIO

Formatos de teste

Teste de determinação de faixa

18. Este é o teste de citotoxicidade inicial, realizado para determinar as doses iniciais para o teste principal. Os ensaios NRU testam oito concentrações da substância de ensaio ou do controle positivo (CP), diluindo a solução do produto químico de ensaio em diluições de log para cobrir uma gama de concentrações elevada (ver parágrafos 29-34).

Teste principal

19. O teste principal dos ensaios de citotoxicidade é realizado para determinar o valor IC_{50} (ver anexo 3). A concentração mais próxima do valor de IC_{50} do teste serve como ponto médio das concentrações no teste principal. Em comparação com o teste de determinação de faixa (range finder), o teste principal usa um fator de diluição menor para as concentrações testadas (ver parágrafo 35).

Preparativos para o ensaio 3T3 NRU

Células

20. A linha celular de fibroblastos permanentes de camundongos, células BALB/c 3T3, clone 31, deve ser obtida a partir de repositórios de cultura de células nacionais/ internacionais bem qualificados.

21. Todo o estoque de células e culturas usadas para testes deve ser certificado como livre de micoplasma e contaminação bacteriana e deve ser verificado rotineiramente (conforme protocolos específicos de laboratório e procedimentos operacionais padrão – POP).

Mídia e condições de cultura

22. Os laboratórios devem seguir os POP em todos os aspectos da cultura celular. A passagem celular de rotina para as células BALB/c 3T3 deve usar meio de cultura contendo Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com glicose alta (4,5g/L), suplementado com soro de vitelo recém-nascido inativado por calor a 10%[2] (NCS) e 4mM L-Glutamina.

[2] *O soro de bezerro também é aceitável (ICCVAM, 2006c).*

Os antibióticos serão utilizados no meio de cultura que contém a substância em estudo (ver parágrafo 46).

A preparação adequada do meio de cultura deve incluir o ajuste do pH (por exemplo, com bicarbonato de sódio) e a manutenção adequada da osmolaridade. As células devem ser cultivadas a 37°C ±1°C, 90% ± 10% de umidade e 5,0% ± 1,0% CO2/ar. As condições de cultura de células devem assegurar que o tempo do ciclo celular esteja dentro do intervalo histórico da linha celular. O tempo histórico de ciclo celular (tempo de duplicação) para células 3T3 foi de, aproximadamente, 18 horas (média de três laboratórios) no estudo de validação do NICEATM-ECVAM (ICCVAM, 2006a [Seção 2.3.1.1]).

Preparação de culturas

23. As células 3T3 do estoque preservado criogenicamente devem ser subcultivadas, pelo menos, duas vezes antes de usar as células no ensaio 3T3 NRU. Removem-se as células de frascos através de tripsinização, quando as células atingem 50% a 80% de confluência. As passagens de células 3T3 do estoque congelado

devem ser limitadas a, aproximadamente, 18 passagens, para evitar alterações fenotípicas e genotípicas que podem ocorrer à medida que a cultura envelhece.

24. As células do meio de cultura de rotina devem ser plaqueadas em placas de microtitulação de cultura de densidade de 2,0-3,0 x 103 células/100μ/poço. Deve-se consultar o anexo 4 para se obter o modelo recomendado de placa de 96 poços. Cultivar as células durante 24 horas $\pm$2 horas para formar uma monocamada confluente inferior abaixo da metade (<50%). Este período de incubação assegura a recuperação e a aderência adequadas da célula para permitir a progressão para a fase de crescimento exponencial.

Preparativos para o ensaio NHK NRU

Células

25. Inicialmente, NHK normal não transformada pode ser substituída pelas células BALB/c 3T3 para o ensaio de citotoxicidade. As células NHK devem vir de células de prepúcio neonatal criopreservadas, primárias ou secundárias, adquiridas apenas de fontes comerciais, em vez de se preparar uma cultura primária a partir de tecidos doados.

26. Todo o estoque celular e todas as culturas utilizadas para testes devem ser certificados como livres de micoplasma e contaminação bacteriana e devem ser verificados rotineiramente (conforme protocolos laboratoriais específicos e POP).

Mídia e condições de cultura

27. Os laboratórios devem seguir os POP em todos os aspectos da cultura celular. A passagem celular de rotina para as células NHK deve incluir um meio de cultura basal de queratinócitos, definido sem soro e suplementado com 0,0001ng/mL de fator de crescimento epidérmico recombinante humano, 5μg/mL de insulina, 0,5μg/mL de hidrocortisona, 30μg/mL gentamicina, 15ng/mL de anfotericina B, 0,10mM de cálcio e 30μg/mL de extrato de hipófise bovina (por exemplo, KBM® [Clonetics CC-3104], KBM® SingleQuots® [Clonetics CC-4131] e Clonetics Calcium SingleQuots® [CC-4202]). As células devem ser incubadas a 37°C $\pm$ 1°C, 90% $\pm$ 10% de umidade e 5,0% $\pm$ 1,0% CO_2/ar. As condições de cultura celular devem assegurar que o tempo do ciclo celular esteja dentro do intervalo histórico do tipo de célula. O tempo histórico do ciclo celular (tempo de duplicação) para as células NHK foi de, aproximadamente, 19 horas (média de três laboratórios) no estudo de validação do NICEATM-ECVAM (ICCVAM, 2006a [Seção 2.3.1.2]).

Preparação de culturas

28. Propagar as células NHK (da reserva, criopreservadas) em frascos de cultura de tecidos de 25cm^2. Quando as células atingem 50% a 80% de confluência, remover as células dos frascos por meio de tripsinização (resfriar a tripsinização adicionando-se solução neutralizadora de tripsina).

29. Preparar uma suspensão de células de 1,6 - 2,0x104 células/mL em meio de cultura de rotina NHK. Despejar 125μL da suspensão de células (2,0 - 2,5x103 células/poço) nos poços de teste de uma placa de microtitulação de cultura de tecidos de 96 poços. Consultar o anexo 4 para obter o modelo recomendado de placa de 96 poços. Dispensar 125mL de meio de cultura de rotina nos poços brancos periféricos.

30. Cultivar as células por 48-72 horas (37°C $\pm$ 1°C, 90% $\pm$ 10% umidade, 5,0% $\pm$ 1,0% CO_2/ar) para que as células formem uma monocamada confluente >20%. Este período de incubação assegura a recuperação e a aderência da célula adequada para permitir a progressão para a fase de crescimento exponencial.

Preparação da Substância em Teste

Testar substâncias em solução

31. Equilibrar as substâncias em teste, à temperatura ambiente, antes de dissolver e diluir. Preparar a substância em teste imediatamente antes de usar, em vez de preparar a granel para uso em testes subsequentes. As soluções devem ser claras e não ter precipitado perceptível. Recomenda-se a avaliação microscópica das soluções da substância em estudo, para auxiliar na determinação visual da solubilidade da substância em teste. Preparar pelo menos 1-2ml de volume total de cada diluição de estoque para garantir a quantidade adequada para todos os poços de teste em uma única placa de 96 poços. A preparação de substâncias de ensaio sob luz vermelha ou amarela é recomendada para preservar substâncias que se degradam com a exposição à luz (ver anexo 6).

32. O meio de cultura é o solvente preferido para dissolver as substâncias de ensaio, seguido por dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol (EtOH). Ver anexo 5, para o protocolo de solubilidade, e anexo 6, para as propriedades físico-químicas adequadas das substâncias de ensaio. A preparação das substâncias de ensaio no meio de cultura seguirá as etapas de solubilidade (níveis 1, 2 e 3 do anexo 5). Para substâncias dissolvidas em DMSO ou EtOH, a concentração final para aplicação nas células não deverá ser superior a 0,5% (v/v), nos controles do veículo (VC)

e em todas as oito concentrações de teste. A concentração de DMSO ou EtOH deve ter a concentração mínima necessária para dissolver a substância em teste.

33. Preparar a solução-mãe para cada substância de ensaio na concentração mais elevada que se considere solúvel no ensaio de solubilidade (anexo 5). A maior concentração de teste aplicável às células em um teste de determinação de faixa é:

- 0,5 vez a concentração solúvel mais elevada encontrada no ensaio de solubilidade, se a substância for solúvel no meio de cultura ou
- 1/200 a maior concentração encontrada para ser solúvel no teste de solubilidade, se a substância for solúvel em DMSO ou EtOH

Preparação de diluições da substância de ensaio para o teste do indicador de faixa

34. Este esquema de diluição de log é apropriado para a preparação de substâncias de ensaio para o teste de medição de faixa (ver parágrafo 13).

35. Dissolver a substância em teste em DMSO ou EtOH a 200m/mL, para preparar a solução de reserva da substância a ser testada (ver figura 1 no anexo 5). Preparar as sete concentrações mais baixas por sucessivas diluições em série que diminuam em uma unidade de log cada (por exemplo: 0,1mL de solução em 0,9mL de solvente).

36. Cada concentração deve ser 200 vezes maior do que a concentração a ser testada. Faça uma diluição de 1:100, diluindo uma parte da substância de teste dissolvida em cada tubo com 99 partes de meio (por exemplo, 0,1mL de substância de teste em DMSO ou EtOH + 9,9mL de meio) para derivar as oito concentrações de 2x para aplicação nas células. Cada concentração da substância de teste 2x conterá, então, 1% (p/v) de solvente.

37. As células 3T3 terão 50μL de meio de cultura de rotina nos poços antes da aplicação da substância de teste. Adicionar 50μL de qualquer concentração específica de substância de teste 2x aos poços designados irá diluir adequadamente a substância de teste (por exemplo, a concentração mais alta em poço será 1.000μg/mL) em 100μL e a concentração de solvente nos poços será de 0,5% (p/v).

38. As células NHK terão 125μL de meio de cultura nos poços antes da aplicação da substância em estudo. Adicionar 125μL de qualquer concentração específica

de substância em teste 2X aos poços designados diluirá adequadamente a substância de teste (por exemplo, a concentração máxima em poço será 1.000μg/mL) em 250μL e a concentração de solvente nos poços será de 0,5% (p/v).

39. Uma substância em teste preparada em meio ou solvente pode precipitar após transferência para o meio de cultura de rotina.

Preparação das diluições da substância em estudo para o teste principal

40. O teste principal (ver parágrafo 14) requer um fator de diluição menor do que o teste do indicador de faixa. Recomenda-se uma série de diluições com concentrações geométricas decimais que pode ser usada em testes toxicológicos, pois tal série tem a vantagem de que experimentos independentes, com fatores de dose ampla ou estreita, podem ser facilmente comparados, dado que compartilham concentrações idênticas. O fator de diluição de 3,16 ($= \sqrt[2]{10}$) divide um log em duas etapas equidistantes; o fator 2,15 ($= \sqrt[3]{10}$), em três etapas; o fator 1,78 ($= \sqrt[4]{10}$), em quatro etapas; o fator 1,47 ($= \sqrt[6]{10}$), em seis etapas; e o fator 1,21 ($= \sqrt[12]{10}$) em 12 etapas (ver tabela 1). Levando-se em consideração os erros de pipetagem, um fator de progressão de 1,21 é considerado o menor fator praticamente alcançável.

Por exemplo, para fazer diluições com o fator de diluição de 1,47: diluir 1 volume da concentração mais alta adicionando-se 0,47 volumes de diluente. Após o equilíbrio, diluir 1 volume desta solução adicionando-se 0,47 volumes de diluentes, etc. (ICCVAM, 2001b).

Tabela 1. Doses máximas para substâncias em teste preparadas no meio de cultura de rotina para o teste principal

Número de diluições iguais (fator de diluição)	Unidades de Concentração[1]
2 (3.16)	10, 31.6, 100
3 (2.15)	10, 21.5, 46.4, 100
4 (1.78)	10, 17.8, 31.7, 56.4, 100
6 (1.47)	10, 14.7, 21.5, 31.6, 46.4, 68,1, 100
12 (1.21)	10, 12.1, 14.7, 17.8, 21.5, 26.1, 31.6, 38.3, 46.4, 56.2, 68.1, 82.5, 100

[1] Um exemplo de unidades de concentração é μg/mL.

Preparação de substâncias de teste em meio

41. A concentração máxima de substância química de teste em estoque no meio para os testes principais será 100 mg/mL ou a dose máxima solúvel dividida por 2. Se for verificada citotoxicidade mínima ou inexistente no ensaio de detecção de faixa (ver parágrafo 40), a dose máxima para os principais testes é estabelecida da seguinte forma:

a) Pesar a substância de teste em um tubo de vidro (o vidro é preferido, mas o poliestireno pode ser aceitável) e acrescentar o meio de cultura de rotina para obter a concentração de 200mg/mL. Se a solução de 200mg/mL usada no teste de faixa de medição não produzir citotoxicidade, então uma solução estoque de até 500mg/mL pode ser preparada para o teste principal. Misturar a solução usando os procedimentos de mistura que produziram solubilidade ao se realizar o teste de solubilidade (anexo 5);

b) Se a solubilidade completa for alcançada no meio, então preparar sete soluções adicionais de dosagem de estoque serial, a partir do estoque 2x de 200mg/mL (ou maior concentração);

c) Se a substância em estudo for insolúvel em meio a 200mg/mL, adicionar o meio, em pequenas quantidades incrementais, para tentar dissolver a substância usando a sequência de mistura especificada no anexo 5.

   Se forem observados precipitados no meio, diluições de 2x, deve-se continuar com o teste e fazer as observações e a documentação apropriadas. Procedimentos de solubilidade mais rigorosos podem ser empregados, se necessários, com base nos resultados do teste do indicador de faixa.

d) Usar a solução de estoque solúvel mais alta para preparar as sete soluções adicionais de dosagem de estoque serial.

Doses máximas para substâncias em teste preparadas em DMSO ou EtOH para o teste principal

42. Se a solução de 200mg/mL usada no teste de faixa de medição não produzir citotoxicidade, então uma solução estoque de até 500mg/mL pode ser preparada para o teste principal. A concentração máxima para o teste principal pode ser determinada com base na concentração máxima de DMSO ou EtOH que possa ser adicionada ao meio de cultura sem causar citotoxicidade (isto é, 0,5% p/v). A maior concentração de substância de teste que pode ser aplicada às células nos testes principais será ≤ 2,5mg/mL, dependendo da solubilidade máxima no solvente.

a) Pesar a substância de teste em um tubo de vidro e adicionar o solvente apropriado (determinado a partir do teste de solubilidade original – anexo 5) para obter a concentração de 500mg/mL. Misturar a solução da substância em teste usando a sequência de mistura dos procedimentos especificados no anexo 5. Se a solubilidade completa for alcançada no solvente, então preparar sete soluções adicionais de dosagem serial a partir do estoque de 500mg/mL 200x;

b) Se a substância de teste for insolúvel em solvente a 500mg/mL, adicionar solvente, em pequenas quantidades incrementais, para tentar dissolver a substância, utilizando novamente a sequência de procedimentos de mistura;

c) Usar a solução de estoque solúvel mais alta para preparar as sete soluções de dosagem de estoque serial adicionais. Se precipitados forem observados nas diluições 2X, continuar com o teste e fazer as observações e a documentação apropriadas.

Condições de teste

Concentrações de substâncias em teste

Controles

43. Controle positivo (CP): lauril sulfato de sódio (SLS; CASRN 151-21-3)[3]. Preparar uma placa separada de 96 poços de oito concentrações de CP, de modo que uma curva dose-resposta completa (anexo 3), ao invés de uma única estimativa pontual, possa ser obtida. Isso ajudará na solução do problema (anexo 6), se necessário. Várias placas de substâncias de teste podem ser executadas com uma única placa de CP. A placa de CP seguirá o mesmo cronograma e os procedimentos usados para as placas de substâncias em teste.

[3] Outras substâncias podem ser utilizadas como controles positivos, desde que a citotoxicidade esteja bem caracterizada e que cada teste forneça uma IC_{50} consistente com a gama histórica gerada pelo laboratório (Ver Seção 3.1.3 do ICCVAM, 2006c).

44. Controle de veículo (CV): o CV consiste em meio de cultura de rotina quando as substâncias em teste são dissolvidas em meio de cultura. Para substâncias de ensaio dissolvidas nos solventes DMSO ou EtOH, o CV consiste em meio de cultura de rotina com a mesma quantidade de solvente (0,5% [p/v]) que é aplicada à placa de teste de 96 poços.

Procedimento de teste

Teste de detecção de faixa

45. Testar oito concentrações (ver parágrafo 30) da substância em teste diluin-

do-se a solução-mãe e utilizando diluições de log (por exemplo, 1: 10, 1: 100, 1: 1000). Se um teste de detecção de faixa não gerar a citotoxicidade adequada para o cálculo de um valor de IC_{50}, devem ser tentadas doses mais elevadas. Se a citotoxicidade é limitada pela solubilidade, procedimentos de solubilidade mais rigorosos para aumentar a concentração de estoque (anexo 5) devem ser empregados.

Teste principal

46. Usar o valor IC_{50} do detector de faixa como uma concentração central e ajustar as diluições para cima e para baixo em intervalos iguais. Alternativamente, a concentração da substância em teste mais próxima do valor IC_{50} do detector de faixa pode ser usada como valor central.

47. Usar um fator de diluição menor para a série de concentração do teste principal (por exemplo, fator de diluição de $\sqrt[6]{10} = 1{,}47$) do que aquele usado para o teste de detecção de faixa. A inclinação da concentração-resposta do detector de faixa pode ser usada para aproximar o fator de diluição.

48. Cubrir a faixa de concentração relevante em torno do IC_{50} (>0% e <100% do efeito), de preferência com vários pontos de um efeito graduado, mas com um mínimo de dois pontos, um em cada lado do IC_{50}, e evitar muitas concentrações (ex. >6) em qualquer uma das extremidades do espectro de concentração.

49. Realizar, no mínimo, dois testes principais para uma substância em teste e calcular a média dos resultados da IC_{50}.

Ensaio 3T3 NRU

Dia 1

50. Preparar uma suspensão de células e distribuir na placa (ver parágrafo 24).

Dia 2

46. Remover o meio de cultura e rotina das células após o período de incubação, invertendo cuidadosamente a placa. Com cuidado, limpar a placa com uma toalha de papel estéril, para remover o meio de cultura residual. Adicionar 50μL de substância em teste no meio de diluição da substância de teste (DMEM sem soro, L-Glutamina 4mM 200UI/mL de penicilina, estreptomicina 200μg/mL) aos

poços de ensaio e amostras em branco apropriadas. Adicionar 50µl de meio de diluição da substância de teste aos poços CV em branco apropriados. Consultar o anexo 4 para obter o modelo recomendado de placa de 96 poços. Incubar as células por 48 horas ± 0,5 horas.

Dia 4

Procedimento Microscópico

47. Após, pelo menos, 46 horas de tratamento, examinar cada placa com um microscópio de contraste de fase para identificar erros sistemáticos de semeadura celular e características de crescimento das células de controle e tratadas. Registrar quaisquer alterações na morfologia das células, devido aos efeitos citotóxicos da substância em teste, mas não usar esses registros para qualquer medida quantitativa de citotoxicidade. As características de crescimento indesejáveis das células de controle podem indicar erro experimental e podem ser causa de rejeição do ensaio. Realizar o ensaio NRU (ver parágrafos 51-56).

Ensaio NHK NRU

Dia 1

48. Preparar uma suspensão de células e distribuir para a placa (ver parágrafos 23-25).

Dia 3

49. Após o período de incubação, não remover o meio de cultura de rotina NHK da placa de teste. Adicionar 125µL da concentração adequada da substância em teste no meio de cultura de rotina (ver parágrafo 33) aos poços apropriados. Incubar as células por 48 horas ± 0,5 hora.

Dia 5

Procedimento Microscópico

50. O exame microscópico das células NHK seguirá as instruções apresentadas no parágrafo 47 para as células 3T3.

Ensaio de absorção de vermelho neutro (VN)

51. Para ambos os tipos de células: após a incubação, inverter cuidadosamente a placa, para remover o meio dos poços, e lavar cuidadosamente as células com

250μL/poço de Solução Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco (D-PBS). Remover a solução de enxágue por inversão da placa e secar com papel absorvente.

52. Para células 3T3: adicionar 250μL de 25μg/mL de corante VN em DMEM com 5% NCS, 4mM L-Glutamina, 100UI/mL de Penicilina e 100μg/mL de estreptomicina em todos os poços (incluindo em branco) e incubar a 37°C ± 1°C, 90% ± 10% de umidade, 5,0% ± 1,0% de CO_2/ar por 3,0 horas ± 0,1h (continuar a 3T3 NRU no parágrafo 54).

53. Para células NHK: adicionar 250μL de 33μg/mL de corante vermelho neutro (VN) em todos os poços (incluindo os brancos) e incubar a 37°C ± 1°C, 90% ± 10% de umidade, 5,0% ± 1,0% CO_2/ar durante 3,0 horas ± 0,1h (continuar a NHK NRU no parágrafo 54).

54. Após a incubação, remover o meio VN e enxaguar cuidadosamente as células com 250μL/poço de D-PBS pré-aquecido. Remover a solução como acima. Adicionar 100μL de solução de dessorção do VN (preparado de frasco 49 partes de água + 50 partes de etanol + 1 parte de ácido acético glacial) a todos os poços (incluindo em brancos) para extrair o corante.

55. Agitar rapidamente as placas de microtitulação num agitador de placas de microtitulação durante 20-45 minutos. Proteger as placas da luz enquanto agitar. As placas devem permanecer paradas por, pelo menos, cinco minutos após a remoção do agitador de placas/misturador. Romper quaisquer bolhas antes de ler a placa.

56. Medir a absorção de luz (densidade óptica – DO) dentro de 60 minutos após a adição da solução de dessorção de VN em cada poço a 540nm ± 10nm (DO_{540}), num leitor de placas de microtitulação (espectrofotômetro), utilizando um branco como referência. Salvar os dados em um formato de arquivo eletrônico apropriado para análise subsequente.

DADOS E RELATÓRIOS

Interpretação de Dados

57. Utilizar um bom julgamento biológico/científico para identificar poços não utilizáveis (por exemplo, poços de teste sem células, poços com culturas contaminadas, poços com substância de teste precipitada) que serão excluídos da análise de dados.

58. Após a subtração do valor de DO_{540} em branco, calcular a viabilidade celular para cada poço de teste como percentagem do valor médio de CV DO_{540}. A viabilidade da célula pode ser calculada usando-se um modelo de planilha (por exemplo, o Microsoft Excel®). Idealmente, as oito concentrações de cada substância testada abrangerão a faixa de ausência de efeito até a inibição total da viabilidade celular.

59. Efetuar uma análise da função Hill dos dados de viabilidade de células replicadas para cada concentração utilizando software estatístico (por exemplo, GraphPad PRISM® http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm) para calcular o IC_{50} de cada substância em teste. A função Hill é recomendada, porque todas as informações de resposta à dose são usadas, ao invés de apenas alguns pontos ao redor da IC_{50}. A função Hill também fornece a inclinação da curva dose-resposta (ver anexos 1 e 6 – parágrafo 5).

Qualidade e quantidade de dados

Teste dos critérios de aceitação

60. A média da absorbância corrigida da esquerda (CV1) e a média da absorbância corrigida das colunas da direita (CV2) dos CV (consultar o anexo 4 para o modelo recomendado de placa de 96 poços) não devem diferir em mais de 15% da absorção média corrigida de todos os CV.

61. Pelo menos, um valor de citotoxicidade, calculado $>0\%$ e $\leq 50\%$ de viabilidade, e um valor de citotoxicidade, calculado $>50\%$ e $<100\%$ de viabilidade, devem estar presentes. Exceção: se um teste tiver apenas um ponto entre 0 e 100% e o menor fator de diluição prático (ou seja, 1,21) for usado e todos os outros critérios de aceitação do teste forem atendidos, então o teste é aceitável.

Critérios adicionais de aceitação de testes para o CP

62. A curva dose-resposta ajustada ao CP deve ter R^2 (coeficiente de determinação) $\geq 0{,}85$ para o ajuste do modelo Hill.

63. O valor de IC_{50} do CP deve estar dentro de $\pm 2{,}5$ desvios-padrão (DP) da média histórica estabelecida pelo laboratório. Dez testes de citotoxicidade do controle positivo, no mínimo, devem ser realizados para desenvolver o banco de dados histórico inicial (ICCVAM, 2006c).

Avaliação de Resultados

Resultados antecipados

64. Para o teste NRU, os valores do DO_{540} em branco devem ser aproximadamente 0,05 (ICCVAM, 2006a). A DO_{540} corrigida para os CV pode ser esperada para a média de 0,476 ± 0,117 (SD), para o 3T3 NRU, e 0,685 ± 0,175 (SD), para o NHK NRU (ICCVAM, 2006a). Os valores de IC_{50} para o controle positivo, SLS, devem ser 41,5 ± 4,8 (DP) μg/mL (n=233), para o ensaio 3T3 NRU, e 3,11 ± 0,72μg/mL (n=114), para o ensaio NHK NRU. O anexo 3 mostra uma curva dose-resposta típica para SLS no ensaio 3T3 NRU. Os resultados de IC_{50}, para as substâncias de teste no estudo de validação de citotoxicidade basal *in vitro* do NICEATM/ECVAM, variaram de 0,005 a 38,878μg/mL (1,1 x 10-5 a 422mM), para o método de teste 3T3 NRU, e 0,00005 a 49,800μg/mL x 10-8 a 49.800mM), para o método de teste NHK NRU (ICCVAM, 2006a).

Aplicação de Resultados

Determinação das doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda (ver anexo 7)

65. As regressões IC_{50}-DL_{50} usando os valores de IC50 do 3T3 NRU ou do NHK NRU com os do CR (controle com substâncias de referência) usando os 47 substâncias químicas que eram comuns ao CR e ao estudo de validação do NICEATM-ECVAM mostraram que nem a regressão foi significativamente diferente da regressão do RC das 47 substâncias químicas (p=0,642, para a regressão 3T3 NRU, e p=0,759, para a regressão NHK NRU). Assim, pode-se utilizar 3T3 NRU IC50 ou NHK NRU IC_{50}. Usar o valor de IC_{50} em mM na seguinte fórmula de regressão para estimar o log DL_{50} em mmol/kg:

$$\log DL_{50} \text{ (mmol/ kg)} = 0{,}439 \log IC_{50} \text{ (mM)} + 0{,}621 \text{ (ICCVAM, 2006a).}$$

Converter o log DL_{50} em DL_{50} e depois converter para unidades de mg/kg, multiplicando pelo peso molecular da substância em teste.

66. A dose inicial para o UDP é a próxima dose menor do que a DL_{50} estimada na progressão da dose padrão. A progressão da dose por defeito para o UDP é de 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550 e 2.000mg/kg, utilizando um teste limite de 2.000mg/

kg, ou 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1.750 e 5.000mg/kg, utilizando um teste limite de 5.000mg/kg (OECD, 2008).

67. A dose inicial para o método ATC e o estudo de observação para o FDP é a próxima dose menor do que a DL_{50} estimada na progressão da dose padrão. A progressão da dose por defeito para o método ATC e o FDP é de 5, 50, 300 ou 2.000mg/kg, para o teste limite de 2.000mg/kg, ou 5, 50, 300, 2.000 ou 5.000mg/kg, para os 5.000mg/kg teste de limite de kg (OECD, 2001a, b).

68. Para substâncias sem peso molecular, valores de IC_{50} em μg/mL podem ser usados na seguinte fórmula de regressão para estimar o DL_{50} em mg/kg:

$$\text{Log } DL_{50} \text{ (mg/kg)} = 0{,}372 \log IC_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2{,}024 \text{ (ICCVAM, 2006a)}$$

Relatório de teste

69. O relatório do teste deve conter as seguintes informações sobre os substâncias químicas e substâncias em teste:

Substâncias químicas em Teste e Substâncias de Controle

- Nome(s) da substância/substância química, sinônimos, CASRN, peso da fórmula, se conhecidos
- Pureza e composição da substância ou preparação (em percentagem[ns] por peso)
- Propriedades físico-químicas (por exemplo, estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, classe química, solubilidade e água)
- Solubilização das substâncias de ensaio/controle (por exemplo, centrifugação, sonicação, aquecimento, moagem) antes dos testes, se aplicável

Solvente

- Nome do solvente
- Justificativa para a escolha do solvente
- Solubilidade da substância em estudo no solvente
- Porcentagem de solvente no meio de tratamento e controles do veículo

Células

- Tipo de célula usada e fonte de células

- Ausência de micoplasma ou contaminação bacteriana
- Número de passagem da célula

Condições de teste (1); informação experimental

- Datas de início e conclusão da experiência
- Detalhes dos procedimentos de teste utilizados
- Descrição das modificações introduzidas no procedimento de ensaio
- Referência a dados históricos do modelo de teste (por exemplo, solvente e PC)
- Descrição dos critérios de avaliação utilizados

Condições de teste (2); informação de cultura celular

- Números de lote e fabricantes de produtos para reagentes, soro, meio, suplementos, cultura, etc.
- Composição do meio de cultura utilizado na cultura celular de rotina e na aplicação da substância em estudo

Condições de teste (3); incubação antes e depois do tratamento

- Condições de incubação (isto é, 37°C ± 1°C, 90% ± 10% de umidade e 5,0% ± 1% CO_2/ ar)
- Duração da incubação (pré-tratamento; pós-tratamento)

Condições de teste (4); tratamento com substância de teste

- Justificativa para a seleção das concentrações da substância em estudo
- Solubilidade da substância em estudo e justificação da concentração de ensaio mais elevada
- Composição do meio de tratamento
- Duração do tratamento com substâncias em estudo

Condições de teste (5); Teste de viabilidade VN

- Composição do meio de tratamento com VN
- Duração da incubação com VN
- Condições de incubação (isto é, 37°C ± 1°C, 90% ± 10% de umidade e 5,0% ± 1,0% CO_2/ar)
- Condições de extração de VN (extratante; duração)
- Comprimento de onda utilizado para leitura espectrofotométrica da densidade óptica de VN

Informações sobre o patrocinador e a instalação de teste

- Nome e endereço do patrocinador, das instalações de teste, do diretor de estudo e dos técnicos de laboratório participantes
- Justificativa do método de ensaio e protocolo específico utilizado

Integridade do Método de Teste

- O procedimento usado para garantir a integridade (ou seja, precisão e confiabilidade) do método de teste ao longo do tempo (por exemplo, uso dos dados do CP)

Critérios para um teste aceitável

- Diferenças aceitáveis de VC entre cada coluna de poços e a média de ambas as colunas
- Intervalos de CP simultâneos aceitáveis com base em dados históricos (incluir os dados históricos de resumo)
- Número de pontos tóxicos em ambos os lados do IC_{50} (ou seja, número de pontos >0 e $\leq 50\%$ de viabilidade e >50 e $<100\%$ de viabilidade)

Resultados

- Tabulação de dados de amostras de teste individuais (por exemplo, valores de IC_{50}, para a substância de referência, e CP, leituras de DO_{540} absolutas e derivadas, relatadas na forma tabular, incluindo dados de repetições, conforme apropriado, e os meios e desvios padrão para cada experimento).

Descrição de outros efeitos observados

- Morfologia celular, precipitado, cristais de NR, etc.

Discussão dos Resultados

Conclusão

LITERATURA

(1) Bondesson, I., Ekwall, B., Hellberg, S., Romert, L., Stenberg, K., Walum, E. (1989), MEIC - A new international multicenter project to evaluate the relevance to human toxicity of in vitro cytotoxicity tests. Cell. Biol. Toxicol. 5:331-347.

(2) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Letters 24:119-124.

(3) Bulgheroni, A., Kinsner-Ovaskainen, A., Hoffmann, S., Hartung, T., Prieto, P. (2009), Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) from the 28 day repeated dose toxicity studies in rats. Regul Toxicol Pharmacol Feb; 53(1):16-9.

(4) Ekwall, B., Ekwall, B., Sjöström, M. (2000), MEIC evaluation of acute systemic toxicity: Part VIII. Multivariate partial least squares evaluation, including the selection of a battery cell line tests with a good prediction of human acute lethal peak blood concentrations for 50 chemicals. ATLA, 28: 201-234.

(5) US EPA (1996), Product Properties Test Guidelines. OPPTS 830.7840 Water Solubility: Column Elution Method; Shake Flask Method. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA 712–C–98–041. Available: [http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/830_Product_Properties_Test_Guideli nes/Series/830-7840.pdf]

(6) Halle, W. (1998), Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (DL50) zur Einsparung von Tierversuchen. Life Sciences/ Lebenswissenschaften, Volume 1, Jülich: Forschungszentrum Jülich.

(7) Halle, W. (2003), The Registry of Cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (DL50) and to reduce testing in animals. Alternatives to Laboratory Animals 31:89-198. (English translation of Halle 1998).

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

(9) ICCVAM (2006a), Background Review Document: In Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_brd.htm]

(10) ICCVAM (2006b), Peer Review Panel Report: The Use of In Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_scpeerrev.htm]

(11) ICCVAM (2006c), ICCVAM Test Method Evaluation Report: In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmer.htm]

(12) ICCVAM (2001a), Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity. NIH Publication Nº 01-4499. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: ENV/JM/MONO(2010)20 ENV/JM/MONO(2010)20 [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_cyto_wksp.htm]
(13) ICCVAM (2001b), Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity. NIH Publication Nº 01-4500. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_cyto_guide.htm]
(14) OECD. 2001a. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD Guideline For Testing of Chemicals Nº 423, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]
(15) OECD (2001b), Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nº 420, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]
(16) Seibert, H., Balls, M., Fentem, J.H., Bianchi, V., Clothier, R.H., Dierickx, P.J., Ekwall B., Garle, J.J., Gómez-Lechón, M.J., GribaDLo, L., GüDLen, M., Liebsch, M., Rasmussen, E., Roguet, R., Shrivastava, R., and Walum, E. (1996), Acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. The report and recommendations of ECVAM Workshop 16. Alternatives to Laboratory Animals 24:499-510.
(17) Spielmann, H., Genschow, E., Liebsch, M., and Halle, W. (1999), Determination of the starting dose for acute oral toxicity (DL50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. Altern. Lab. Anim. 27:957-966.
(18) Stokes, W., Casati, S., Strickland, J., Paris, M. (2008), Neutral Red Uptake Cytotoxicity Tests for Estimating Starting Doses for Acute Oral Toxicity Tests. Cur. Protocol. Toxicol. 36: 20.4.1-20.4.20.
(19) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_weCLome_e.html]

ANEXO 1

Coeficiente de determinação: na regressão linear, denota a proporção da variância em Y e X que é compartilhada. Seu valor varia entre zero e um e é comumente chamado de "R^2". Por exemplo, $R^2 = 0{,}45$ indica que 45% da variância em Y podem ser explicados pela variação em X e que 45% da variância em X podem ser explicados pela variação em Y.

Coeficiente de variação: uma representação estatística da precisão de um teste. É expresso em percentagem e é calculado da seguinte forma: (desvio padrão/ média) $\times$ 100%

Confluência: um estado no qual célula em cultura encontra outras células na mesma cultura para formar uma camada completa de células (monocamada). A confluência é determinada como uma percentagem da cobertura celular da superfície de crescimento dos vasos de cultura de tecidos (por exemplo, a monocamada de células é 80% confluente).

Citotoxicidade: os efeitos adversos resultantes da interferência com estruturas e/ou processos essenciais para a sobrevivência, a proliferação e/ou a função da célula. Para a maioria dos substâncias químicas/substâncias, a toxicidade é uma consequência de alterações inespecíficas nas "funções celulares basais" (via mitocôndria, integridade da membrana plasmática, etc.), que podem levar a efeitos em funções específicas do órgão e/ou morte do organismo. Esses efeitos podem envolver a integridade das membranas e do citoesqueleto, o metabolismo celular, a síntese e degradação ou a liberação de constituintes ou produtos celulares, a regulação de íons e a divisão celular.

Função Hill: os valores de IC_{50} são determinados a partir da concentração-resposta usando uma função Hill, que é um modelo matemático logístico de quatro parâmetros que relaciona a concentração da substância em teste com a resposta (tipicamente seguindo uma forma sigmoidal):

$$Y = \text{Inferior} + \frac{\text{Superior - Inferior}}{1 + 10^{(\log EC50 - \log X)\ \text{HillSlope}}}$$

Onde: Y = resposta (ou seja,% de viabilidade), X é a concentração da substância que produz a resposta; Inferior é a resposta mínima (0% viabilidade, toxicidade máxima); Superior é a resposta máxima (viabilidade máxima); EC_{50} é a concentração da substância na resposta intermediária entre Superior e Inferior; e HillSlope descreve a inclinação da curva. Quando Superior = 100% viabilidade e Inferior = 0% viabilidade, o EC_{50} é igual ao IC_{50}.

Função de Hill (reorganizado): algumas respostas de dose incomuns não se encaixam bem na função Hill. Para obter melhor ajuste do modelo, o parâmetro Inferior pode ser estimado sem restrições (Inferior não é necessariamente qualquer valor particular). No entanto, quando Inferior ≠ 0, o EC_{50} relatado pela função Hill não é o mesmo que o IC_{50}, já que a função Hill define EC_{50} como o ponto intermediário entre Superior e Inferior. Assim, o cálculo da função Hill usando o software Prism® foi reorganizado para calcular a concentração correspondente à IC_{50} da seguinte forma:

$$\text{LOG } IC_{50} = \log EC_{50} - \frac{\text{Log}\left(\frac{\text{Superior - Inferior}}{\text{Y - Inferior}} - 1\right)}{\text{Hillslope}}$$

Onde: IC_{50} é a concentração que produz 50% de toxicidade; EC_{50} é a concentração que produz uma resposta a meio caminho entre as respostas Superior e Inferior; Superior é a resposta máxima (sobrevivência máxima); A parte inferior é a resposta mínima (0% de viabilidade, máxima toxicidade); Y = 50 (isto é, 50% de resposta) e HillSlope descrevem a inclinação da resposta. O X da equação de função Hill padrão é substituído, na equação de função Hill rearranjada, pelo IC_{50}.

IC_{50}: concentração de produto químico ou substância em teste produzindo 50% de inibição do ponto final medido (isto é, viabilidade celular).

DL_{50}: valor calculado da dose oral que produz letalidade em 50% dos animais de teste (ratos e camundongos). Os valores de DL_{50} servem como valores de referência para os testes *in vitro*.

Absorção de vermelho neutro (AVN, ou NRU, em inglês): concentração de corante vermelho neutro nos lisossomas das células vivas. A alteração da superfície celular ou da membrana lisossomal por um agente toxicológico causa fragilidade lisossomal e outras alterações adversas que gradualmente se tornam irreversíveis.

O método de teste NRU possibilita a distinção entre células viáveis, danificadas ou mortas, porque essas alterações resultam em menor captação e ligação de

VN mensurável por leituras de absorção de densidade óptica em um espectrofotômetro.

Densidade óptica (DO_{540}): a absorção (medição de DO_{540}) da solução colorida resultante (ponto final colorimétrico) no ensaio de AVN medida a 540nm ± 10nm num leitor espectrofotométrico de placas de microtitulação utilizando em brancos como referência.

Regressão RC (Halle, 1999, 2003): $\log (DL_{50}) = 0{,}435 \log (IC_{50}) + 0{,}625$; para estimar um valor de DL_{50} em mmol/kg (peso corporal) de um valor de IC_{50} em mM. Desenvolvido usando os valores de 347 IC_{50} e oral DL_{50} (282 ratos e 65 camundongos) do CR.

Regressão de milimole RC apenas de ratos: $\log (DL_{50}) = 0{,}439 \log (IC_{50}) + 0{,}621$; para estimar um valor de DL_{50} em mmol/kg (peso corporal) de um valor de IC_{50} em mM; desenvolvido a partir dos valores de IC_{50} (em mM) e valores de DL_{50} orais agudos (em mmol/kg) para as 282 substâncias com valores de DL_{50} de camundongos na base de dados CR (Halle 1998, 2003).

Regressão do peso de RC apenas para ratos: $\log (DL_{50}) = 0{,}372 \log (IC_{50}) + 2{,}024$; para estimar um valor de DL_{50} em mg/kg (peso corporal) de um valor de IC_{50} em μg/mL; desenvolvido a partir dos valores de IC_{50} (em μg/mL) e valores de DL_{50} oral aguda (em mg/kg) para as 282 substâncias com valores de DL_{50} de rato na base de dados CR (Halle 1998, 2003).

Solubilidade: a quantidade de uma substância em teste que pode ser dissolvida (ou completamente misturada com) em meio de cultura ou solvente. O protocolo de solubilidade foi baseado numa Diretriz US EPA (EPA, 1996) que envolve testar a solubilidade em um solvente particular, começando em uma concentração relativamente alta e procedendo a concentrações sucessivamente mais baixas adicionando-se mais solvente, quando necessário, para a dissolução. O teste é parado quando, por observação visual, o procedimento produz uma solução clara sem nebulosidade ou precipitado.

Volatilidade: capacidade de um(a) produto químico/substância em teste para evaporar. Um indicador geral de volatilidade excessiva nos métodos de teste

NRU é a diferença percentual nos valores médios de DO_{540} para as duas colunas CV na placa de teste (a volatilidade excessiva contamina a coluna CV adjacente à concentração mais alta da substância em teste).

Se a diferença for maior do que 15%, pode-se suspeitar de volatilidade excessiva de substância química, especialmente se o CV adjacente à concentração de teste mais alta tiver valor de DO_{540} significativamente reduzido. Volatilidade excessiva pode ser um problema para compostos com gravidade específica menor do que 1.

Baseado em evidência: uma abordagem baseada em evidência é o uso dos pontos fortes e fracos de uma coleção de informações como base para uma conclusão, que pode não ser evidente a partir dos dados individuais. Para estimar as doses iniciais, os dados in vitro devem ser considerados juntamente com todos os outros dados e informações, tais como as previsões da relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR), a DL_{50} de substâncias relacionadas e outros dados existentes, para estimar se uma dose está perto do valor real de DL_{50}.

ANEXO 2

Pré-qualificação do meio de crescimento de queratinócitos epidérmicos humanos (NHK) normal

1. O Meio Basal de Queratinócitos e os Meios de Suplementos, fornecidos por um fabricante para uso com células NHK, devem ser pré-qualificados para demonstrar sua capacidade de executação adequada no ensaio NHK AVN. Os dados do teste de controle de qualidade (CQ) devem ser obtidos do fabricante para cada lote potencial de meio e suplementos.

Sistema de Teste

2. O ensaio NHK AVN analisa as características de crescimento de NHK e a toxicidade in vitro de SLS, medida pelo IC_{50}, para cada meio NHK/combinação de suplemento a ser testado. Testar todas as combinações de meio/suplementos que se espera que sejam usadas nos testes subsequentes da NHK AVN.

3. Estabelecer culturas de NHK usando cada meio/combinação de suplemento a ser testado e subcultivar as células em três dias diferentes, em placas de 96 poços

(1 placa por dia) para três testes subsequentes de citotoxicidade SLS, usando cada meio de teste/combinação de suplemento junto com um meio de controle/suplemento (se disponível) para o qual o desempenho foi previamente estabelecido.

Métodos de Teste

4. Estabelecer culturas de NHK com células criopreservadas, semeadas em frascos de cultura de tecidos individuais, de 25cm^2 utilizando uma combinação de meio/suplemento comprovada (isto é, o meio de controle) e cada combinação de meio/suplemento de teste.

5. Suspender inicialmente as células recém-descongeladas em 9mL de meio de controle e depois adicionar a suspensão de células a frascos de cultura de 25cm^2 contendo controle pré-aquecido ou o meio de teste. Usar densidades de semeadura celular em frascos (1 frasco/densidade/meio) de 1 x 104, 5 x 103 e 2,5 x 103 células.

6. Subcultivar as células em três dias diferentes, em placas de 96 poços, para três testes subsequentes NRU (três placas de teste total [uma placa por dia] para cada combinação meio/suplemento e cada controle).

7. A subcultura das células e a aplicação do SLS seguirão os procedimentos do parágrafo 25, do Documento de Orientação, em referência à confluência celular apropriada. O número de células deve ser registrado, para cada frasco, antes da subcultura nas placas de 96 poços. O tempo de duplicação pode ser medido como uma verificação adicional de garantia de qualidade.

Procedimento de Teste

8. A preparação do SLS deve seguir os principais procedimentos de teste para avaliar compostos em meio de cultura de rotina de queratinócitos. Células cultivadas em meio de controle e em cada combinação de meio de teste/suplemento devem ser testadas em paralelo para sua sensibilidade ao SLS.

9. As concentrações de SLS devem ser as mesmas ou similares àquelas usadas anteriormente com meio de controle/suplementos. A faixa de concentração de SLS utilizada em um estudo de validação *in vitro* foi de 0,6*µ*g/mL - 20,0*µ*g/mL (ICCVAM, 2006a).

Avaliação Microscópica

10. Alterações na morfologia das células, devido a efeitos citotóxicos do SLS (antes da medição de AVN), devem ser registradas. Além da avaliação microscópica geral das culturas de células, as seguintes observações específicas devem ser feitas:

Observações gerais da cultura

- Taxa de proliferação (por exemplo, rápida, justa, lenta)
- Porcentagem de confluência (estimativa diária)
- Número de figuras mitóticas (média por campo)
- Contaminação (presente/não presente)

Observações morfológicas celulares

- Aparência geral (boa, regular, ruim)
- Formação de colônias (ou seja, apertada/definida, justa, solta/migrando);
- Distribuição (igual/desigual)
- Células anormais (aumentadas, vacuoladas, necróticas, manchadas, disformes – média por campo)

Análise de dados e Avaliação de testes

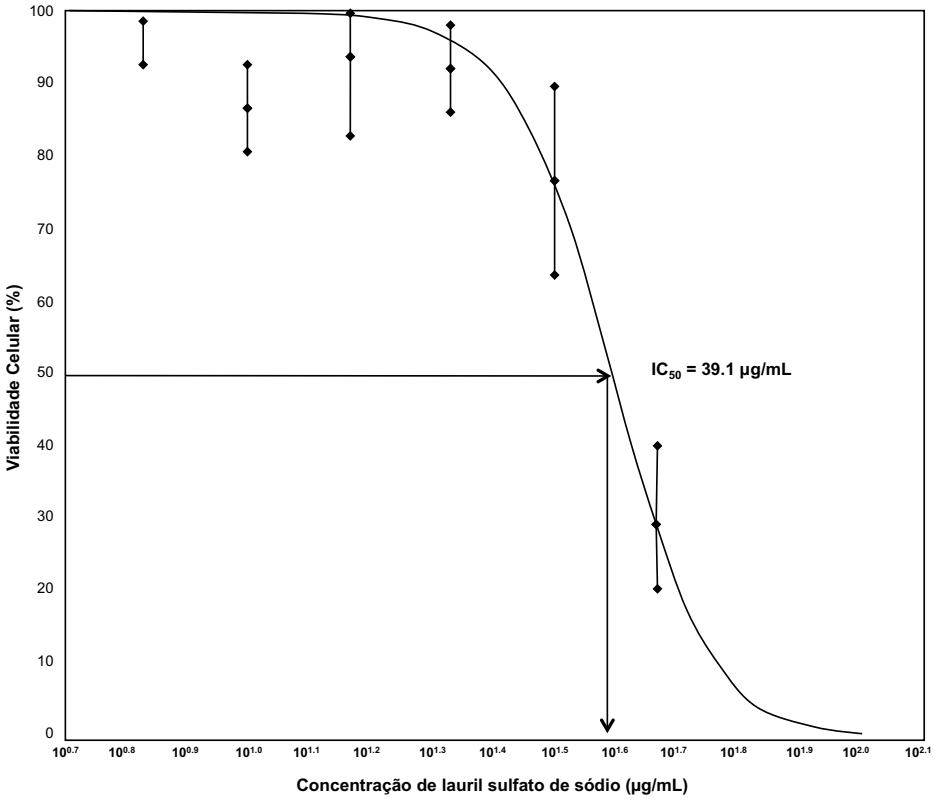
11. Ver Critérios de Aceitação do Teste (parágrafos 60-63) para determinar a aceitabilidade de uma placa de teste. Outros critérios que devem ser considerados incluem:

- DO_{540} corrigido da média dos CV. Nota: A faixa-alvo para a média corrigida de DO540 = 0,248 - 1,123 para os CV (intervalo = média DO_{540} ± 2,5 desvios-padrão; média = 0,685; DP = 0,175; N = 114 [ICCVAM, 2006a])
- Morfologia celular e confluência dos CV no final do tratamento de 48 horas
- Tempo de duplicação das células NHK

12. Utilizar todas as características de crescimento observadas e todos os resultados de testes, além da comparação dos resultados com os dados de controle de qualidade do fabricante do meio, para determinar se as combinações de meio/suplementos funcionam adequadamente.

ANEXO 3

Dose-resposta típica para o lauril sulfato de sódio (SLS) no teste de captação de vermelho neutro, utilizando fibroblastos de camundongos BALB/C 3T3



Os pontos e as barras de erro mostram as médias e os desvios-padrão, respectivamente, para a porcentagem de resposta de viabilidade celular dos seis poços replicados em cada uma das oito concentrações: 6.8, 10, 14.7, 21.5, 31.6, 46.4, 68.1 e 100μg/mL. A linha curva mostra o ajuste da resposta de concentração à função Hill.

ANEXO 4

Modelo para placa de 96 poços

Configuração da placa de 96 poços para controle positivo (CP) e ensaios de substâncias químicas em teste.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CVb	CVb	C1b	C2b	C4b	C4b	C5b	C6b	C7b	C8b	CVb	CVb
B	CVb	CV1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CV2	CVb
C	CVb	CV1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CV2	CVb
D	CVb	CV1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CV2	CVb
E	CVb	CV1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CV2	CVb
F	CVb	CV1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CV2	CVb
G	CVb	CV1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CV2	CVb
H	CVb	CVb	C1b	C2b	C4b	C4b	C5b	C6b	C7b	C8b	CVb	CVb

As linhas de A até H mostram as localizações das oito filas da placa de 96 poços, enquanto as colunas numeradas de 1 a 12 mostram as localizações das 12 colunas da placa de 96 poços.

CV1 e CV2 são os poços de controle de veículo esquerdo (CV1) e direito (CV2), que contêm células, meio de cultura de rotina e solvente (se usado). Os poços CVb são em brancos em CV, que contêm meio de cultura de rotina e solvente, se usado, mas não contém células.

C1-C8 são as oito substâncias de teste ou concentrações de PPC (lauril sulfato de sódio – SLS). C1 é a concentração mais alta e C8 é a mais baixa. Cada concentração testada possui seis poços replicados. Cxb são poços em branco que contêm substância teste ou PC, mas não células.

ANEXO 5

Protocolo de solubilidade

DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DAS SUBSTÂNCIAS DE ENSAIO

1. Este protocolo identifica o solvente que fornece a maior concentração solúvel de uma substância em teste, para a disponibilidade uniforme da substância às células em testes de citotoxicidade basal *in vitro*.

2. O procedimento de teste de solubilidade baseia-se na tentativa de dissolver uma substância de teste em vários solventes, com técnicas de mistura cada vez mais rigorosas. Os solventes a serem utilizados, na ordem de preferência, são meio de cultura celular, DMSO e EtOH. A determinação se uma substância em teste se dissolveu pode basear-se na observação visual usando um microscópio. Uma substância de ensaio foi dissolvida se a solução estiver límpida e não apresentar sinais de turvação ou precipitação (ver o parágrafo 26 no corpo principal do Documento de Orientação).

3. O procedimento do teste de solubilidade é um passo a passo, escalonado para determinar o solvente apropriado para uso nos métodos de teste. Cada nível envolve a tentativa de dissolver a substância de teste em um ou mais solventes, em concentrações de substância em teste que produzirão a mesma concentração (quando dissolvida em qualquer solvente) nas células (com 0,5% [v/v] DMSO ou EtOH para aquelas substâncias não solúvel em meio). Se a substância em estudo não se dissolver no solvente, o volume do solvente é aumentado, de modo a diminuir a concentração da substância a testar por um fator de 10 e, em seguida, a sequência dos procedimentos de mistura é repetida numa tentativa de solubilizar a substância na menor concentração. Se todos os solventes de um determinado nível forem testados simultaneamente e uma substância em teste se dissolver em mais de um solvente, a escolha do solvente seguirá a hierarquia do meio de cultura, DMSO e EtOH. Se, em qualquer camada, uma substância fosse solúvel em meio e DMSO, a escolha do solvente seria o meio. Se a substância fosse insolúvel em meio, mas solúvel em DMSO e EtOH, a escolha do solvente seria DMSO.

Determinação da Solubilidade Utilizando o Procedimento Passo a Passo (escalonada)

4. Nível 1: Pesar 100mg da substância a ser testada num tubo de vidro. Adicionar aproximadamente 0,5mL de meio no tubo para obter 200mg/mL.

Misturar a solução. Se a solubilidade completa for alcançada, procedimentos adicionais de solubilidade não são necessários.

5. Nível 2: Se a substância em teste é insolúvel no nível 1 a 200mg/mL, prosseguir para o nível 2. Pesar 10mg da substância em teste num tubo de vidro. Adicionar aproximadamente 0,5mL de meio para obter 20mg/mL. Misturar a solução. Se a solubilidade completa for alcançada, procedimentos adicionais de solubilidade não são necessários.

6. Nível 3: Se a substância em teste for insolúvel no nível 2 a 200mg/mL, prosseguir para o nível 3. Adicionar meio suficiente, aproximadamente 4,5mL, para tentar dissolver a substância em 2mg/mL usando a sequência de procedimentos de mistura. Se a substância em teste se dissolver no meio a 2mg/mL, não são necessários procedimentos adicionais. Se a substância em teste não se dissolver em meio, pesar 100mg da substância num segundo tubo de vidro e adicionar aproximadamente 0,5mL de DMSO para obter 200mg/mL e misturar a solução. Se a substância em teste não se dissolver em DMSO, pesar 100mg da mesma em outro tubo de vidro e adicionar aproximadamente 0,5mL de EtOH para obter 200mg/mL e misturar a solução. Se a substância é solúvel em qualquer um dos solventes, não são necessários procedimentos adicionais de solubilidade.

7. Nível 4: Se a substância for insolúvel no Meio de Diluição da Substância de Teste, DMSO ou EtOH, no nível 3, então continuar até o nível 4. Adicionar solvente suficiente para aumentar o volume das três (ou quatro) soluções do nível 2 pelo fator de 10 e tentar solubilizar novamente, usando a sequência de procedimentos de mistura. Se a substância em estudo se dissolver, não são necessários procedimentos adicionais de solubilidade. Se a substância em estudo não se dissolver, continuar com o nível 5 e, se necessário, o nível 6, utilizando DMSO e EtOH.

8. Nível 5: Diluir as amostras do nível 4 com DMSO ou EtOH para trazer o volume total para 50mL e tentar solubilizar novamente usando a sequência de procedimentos de mistura.

9. Nível 6: Pesar duas amostras de substância em teste a 10mg cada, adicionar aproximadamente 50mL de DMSO ou EtOH para uma solução de 200μg/mL e seguir os procedimentos de mistura.

Procedimentos de Mistura

10. A seguinte hierarquia de procedimentos de mistura deve ser obedecida para se dissolver a substância em teste:

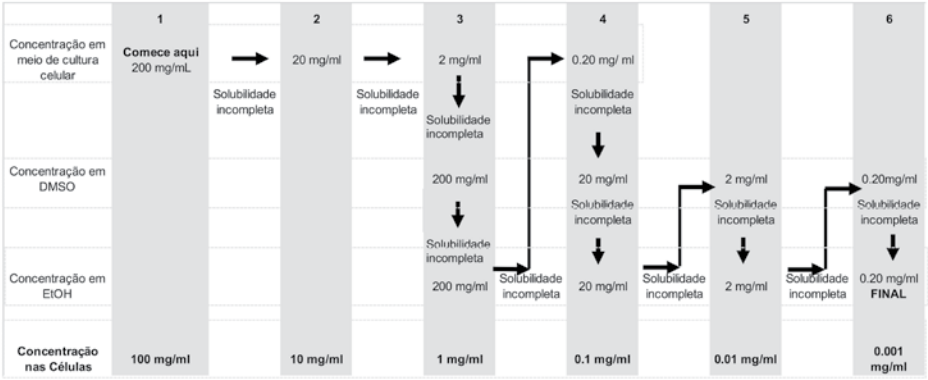
a) Misturar suavemente, à temperatura ambiente, agitando no centrifugador por 1 a 2 minutos;

b) Se a substância em teste não se dissolver, usar sonificação de banho-maria por até 5 minutos;

c) Se a substância de ensaio não for dissolvida após sonificação, aquecer a solução a 37°C durante 5-60 minutos, num banho de água ou numa incubadora de CO_2. A solução pode ser agitada durante o aquecimento (mexer em uma incubadora de CO_2 ajudará a manter o pH adequado);

d) Prosseguir para o nível 2 (e os níveis 3-6, se necessário, repetindo os procedimentos de mistura a-b).

Figura 1. Fluxograma para Determinação da Solubilidade da Substância em Teste em Meio, Dimetil Sulfóxido (DMSO) ou Etanol (EtOH).



ANEXO 6

Solução de problemas

1. O sucesso do resultado do teste NRU depende de se obter crescimento celular adequado; citotoxicidade suficiente para o cálculo de um valor de IC_{50}; ausência de cristais de VN; e bom ajuste dos dados de concentração-resposta para a função de Hill. As células devem estar na fase exponencial de crescimento durante a exposição ao/à produto químico/substância. Os valores de DO_{540} de controle devem ser tipicamente, pelo menos, 0,3 – embora possam ser justificadas medições de DO_{540} mais baixas, se as células parecerem saudáveis e a resposta ao SLS for adequada. Se nenhuma dessas condições for atendida, suspeitar de contaminação por micoplasma (ou outros; por exemplo, bacterianos, fúngicos); das condições ambientais inadequadas (temperatura, CO_2, umidade); do meio de cultura celular; ou dos componentes do meio de cultura celular (por exemplo, soro, para o 3T3, ou fatores de crescimento, para o NHK). Embora 100% de confluência no final do período de exposição sejam satisfatórios para as células 3T3, é indesejável para as células NHK. As células NHK confluentes produzem fatores de crescimento que inibem o desenvolvimento e promovem a diferenciação.

2. A solubilidade é muitas vezes o fator limitante na obtenção de citotoxicidade suficiente para o cálculo de um valor de IC_{50}, especialmente para substâncias de teste relativamente não tóxicas. Substâncias insolúveis podem produzir um precipitado ou um filme na solução de estoque ou nos poços de cultura de células. Outros solventes, que não os recomendados neste protocolo, podem ser utilizados, se a concentração utilizada não produzir citotoxicidade. Procedimentos adicionais, tais como agitação ou aquecimento por períodos mais longos, também podem aumentar a solubilidade da substância em teste. Os usuários devem estar cientes de que a toxicidade inadequada por exposição a substâncias voláteis pode, de fato, ser um artefato da substância "transportada pelo ar" que escapa dos poços. Uma redução na viabilidade das culturas de CV adjacentes à concentração mais elevada de uma substância em teste pode sugerir que a mesma tenha volatilizado (ver poços CV1, no modelo recomendado de 96 poços de palato no anexo 4). No entanto, a citotoxicidade adequada para alguns agentes voláteis é alcançável com o uso de selantes de filme plástico para reter os vapores e minimizar a contaminação dos poços CV vizinhos.

3. Substâncias insolúveis ou instáveis em ambientes aquosos não são compatíveis com os sistemas de teste. Substâncias voláteis podem produzir resultados aceitáveis se for utilizado filme plástico permeável a CO_2 para selar as placas de teste. O teste de substâncias corrosivas é desnecessário, pois não há exigência

regulatória para testes agudos de toxicidade sistêmica oral para corrosivos conhecidos. O método de ensaio 3T3 NRU pode subestimar a toxicidade de substâncias altamente ligadas às proteínas séricas, porque o meio de cultura contém 5% de soro durante a exposição à substância. A toxicidade de substâncias que afetam especificamente os lisossomos pode ser superestimada, pois elas podem afetar a ligação da AVN e, portanto, a retenção na célula. Substâncias vermelhas (e outras substâncias coloridas) que absorvem luz na faixa de densidade óptica da VN podem interferir no teste se permanecerem dentro da célula em quantidades suficientes após a lavagem e forem solúveis no solvente VN.

4. Os cristais de corante VN interferem nas medições de DO_{540}. Os valores DO_{540} em branco podem aumentar de 0,05 a, aproximadamente, 0,10 ou superior. A preparação e a manutenção da solução de corante VN é um fator chave na minimização da formação de cristais. Portanto, a solução corante VC deve ser fresca, filtrada e mantida a 37°C antes da aplicação nas células.

5. O cálculo de um valor IC_{50} apropriado depende do ajuste dos dados de concentração-resposta à função Hill. Tóxicos específicos para atuar em uma única fase do ciclo celular podem produzir uma concentração-resposta na qual a percentagem de viabilidade oscila em torno de 50% com o aumento das doses log do teste detector de faixa. Nessas situações, o teste principal deve focar nas concentrações mais baixas, que produzem 50% de redução na viabilidade. Respostas de concentração, para as quais os patamares de percentagem de viabilidade com concentração crescente, em vez de diminuir para 0%, tendem a ajustar-se fracamente à função de Hill ($R^2 < 0,9$). Geralmente, o ajuste é melhorado, permitindo que a função Hill se ajuste ao parâmetro inferior daquela função, em vez de limitá-la a 0% de viabilidade. No entanto, a EC_{50} da função Hill padrão não será equivalente à concentração que reduz a viabilidade em 50%.

O cálculo da função Hill deve ser reorganizado para calcular o IC_{50} da seguinte forma:

$$\text{Log } IC_{50} = \text{log } EC_{50} - \frac{\text{Log}\left(\frac{\text{Superior} - \text{Inferior}}{\text{Y} - \text{Inferior}}\right) - 1}{\text{Declínio de Hill}}$$

Onde: IC_{50} é a concentração que produz 50% de toxicidade, EC_{50} é a concentração que produz uma resposta a meio caminho entre as respostas Superior e Inferior; Superior é a porcentagem máxima de viabilidade, Inferior é a viabilidade mínima (toxicidade máxima), Y = 50 (isto é, 50% de resposta) e Hill Slope descreve a inclinação da resposta. O X da equação de função Hill padrão é substituído, na equação de função Hill reorganizada, pelo IC_{50}.

6. A previsão dos valores de DL_{50} oral de rato e a determinação de doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda pelos métodos *in vitro* de NRU é projetada como fraca para substâncias com mecanismos de toxicidade que não estão ativos nas células 3T3 ou NHK. Tais mecanismos tóxicos incluem ações específicas mediadas por receptores no sistema nervoso central ou no coração (ICCVAM, 2006a).

7. Os métodos de ensaio NRU *in vitro* podem ser aplicados a uma vasta gama de substâncias, desde que possam ser dissolvidas no meio de cultura celular ou num solvente não tóxico (na concentração utilizada) e não reajam com o meio de cultura. Embora estes métodos de teste possam ser aplicáveis às misturas, nenhum foi avaliado neste estudo de validação. A toxicidade de substâncias que atuam por mecanismos que não se espera ser ativos em células 3T3 ou NHK (por exemplo, aquelas que são especificamente neurotóxicas ou cardiotóxicas) será provavelmente subestimada por estes métodos de teste. Portanto, até que linhas celulares mais apropriadas sejam desenvolvidas, os resultados do teste de citotoxicidade basal com tais substâncias podem não ser relevantes para prever certos efeitos *in vivo.*

ANEXO 7

Exemplos de estimação de doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda

(ver a determinação das doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda – parágrafos 65 a 68)

EXEMPLO PARA VALOR IC_{50}mM

(Ver a figura 1 para representação gráfica)

1,1,1-Tricloroetano (PM 133,4)

3T3 AVN IC50 = 153,3mM

log DL_{50} (mmol/kg) = 0,439 log IC_{50} (mM) + 0,621

(RC Rat-Only Millimole Regression, Regressão Milimole, para ratos apenas [ICC-VAM, 2006a]).

log DL_{50} (mmol/kg) = (0,439 x 0,2,186mM) + 0,621

log DL_{50} (mmol/kg) = 1,580

DL_{50} = 38,019 mmol/kg

DL_{50} estimado = 38,019 mmol/kg x 133,4 mg/mmol DL_{50} estimada = 5072 mg/kg

UDP Dose inicial

Doses padrão: 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550 e 2.000mg/kg (teste limite de 2.000mg/kg)

1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1.750 e 5.000mg/kg (teste limite de 5.000mg/kg)

DL_{50} estimado = 5.072mg/kg; Dose inicial = 5.000mg/kg, uma dose predefinida abaixo da DL_{50} estimada.

Dose Inicial do ATC

Doses padrão: 5, 50, 300 e 2.000mg/kg (teste limite de 2.000mg/kg)

5, 50, 300, 2.000 e 5.000mg/kg (teste limite de 5.000mg/kg)

DL_{50} estimado = 5.072mg/kg; Dose inicial = 5.000mg/kg, uma dose predefinida abaixo da DL_{50} estimada.

Dose Inicial do FDP

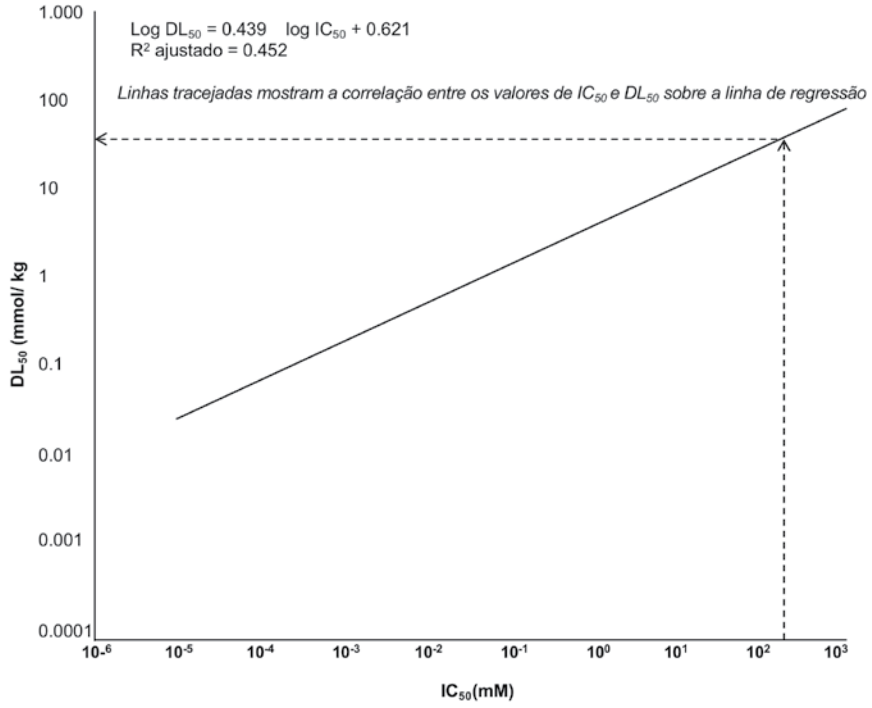
Doses padrão: 5, 50, 300 e 2.000mg/kg (teste limite de 2.000mg/kg)

5, 50, 300, 2.000 e 5.000mg/kg (teste limite de 5000mg/kg)

DL_{50} estimado = 5.072mg/kg; Dose inicial para o estudo de avistamento = 5.000mg/kg, uma dose predefinida abaixo da DL_{50} estimada.

Figura 1

Regressão do Millimole do Rato Somente / RC - Correlação do IC_{50} ao DL_{50} Estimado



EXEMPLO PARA VALOR IC_{50}µg/mL

(Ver a figura 2 para representação gráfica)

1,1,1-Tricloroetano (PM 133,4)

3T3 NRU IC_{50} = 20.453μg/mL

log DL_{50} (mg/kg) = 0,372 log IC_{50} (μg/mL) + 2,024

(RC Rat-Only Weight Regression, Regressão por peso apenas para ratos) [ICCVAM, 2006a]). ICCVAM, 2006a)

logDL_{50} (mg/kg) = (0,372 x 4,311) + 2,024

log DL_{50} (mg/kg) = 3,628

DL_{50} = 4246mg/kg

UDP Dose inicial

Doses padrão: 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550 e 2.000mg/kg (teste limite de 2000mg/kg)

1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1.750 e 5.000mg/kg (teste limite de 5000mg/kg)

DL_{50} estimado = 4246mg/kg; Dose inicial = 2.000mg/kg, uma dose predefinida abaixo da estimativa de DL_{50} para o teste limite de 2.000mg/kg; Dose inicial = 1.750mg/kg, uma dose predefinida abaixo da DL_{50} estimada para o teste limite de 5.000mg/kg.

Dose Inicial do ATC

Doses padrão: 5, 50, 300 ou 2.000mg/kg (teste limite de 2000mg/kg)

5, 50, 300, 2.000 ou 5.000mg/kg (teste limite de 5000mg/kg)

DL_{50} estimado = 4246mg/kg; Dose inicial = 2.000mg/kg, uma dose predefinida abaixo da DL_{50} estimada para o teste limite de 2.000 ou 5.000mg/kg.

Dose Inicial do FDP

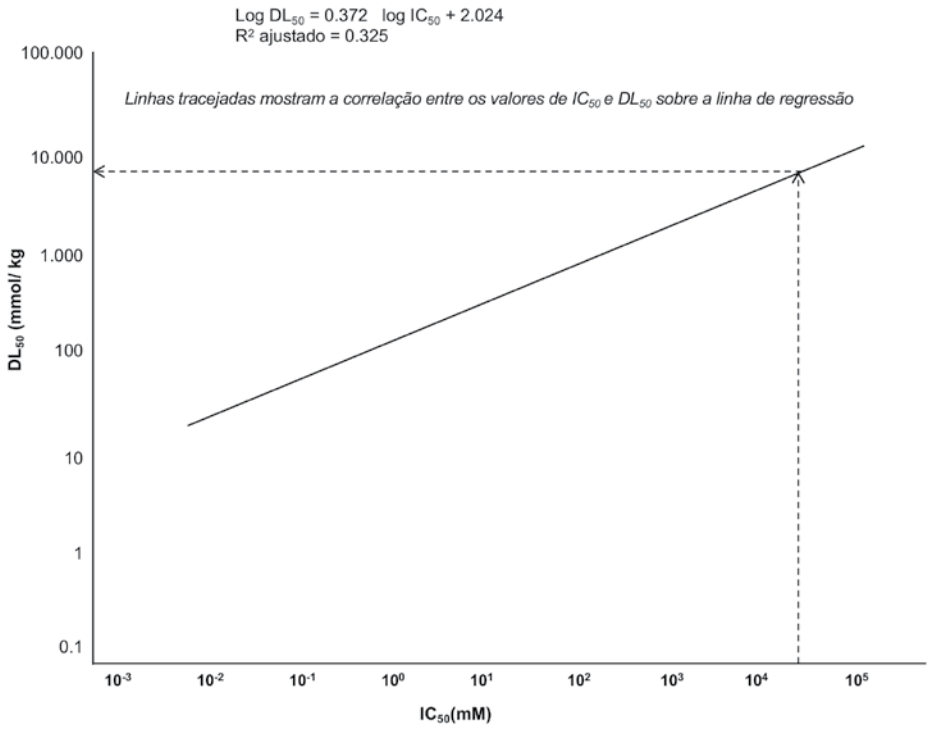
Doses padrão: 5, 50, 300 e 2.000mg/kg (teste limite de 2.000mg/kg)

5, 50, 300, 2.000 e 5.000mg/kg (teste limite de .5000mg/kg)

DL_{50} estimado = 4246mg/kg; Dose inicial para estudo de avistamento = 2.000mg/kg, uma dose predefinida abaixo da DL_{50} estimada para o teste limite de 2000 ou 5.000mg/kg.

Figura 2

Regressão de peso somente do rato RC - Correlação do IC_{50} ao DL_{50} estimado



ANEXO 8

Dados *in vitro* e *in vivo* do Estudo de Validação de Citotoxicidade Basal *in vitro* NICEATM-ECVAM (ICCVAM, 2006a)

Produto Químico em teste	CASRN	3T3 NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	NHK NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	Referência para DL_{50} oral aguda[2,3]	Classe Química
1,1,1-Tricloroetano	71-55-6	17248	8122[5]	12078	Composto orgânico; Hidrocarboneto Halogenado
2-Propanol	67-63-0	3618	5364	5105	Composto orgânico; Álcool
Ácido 5-aminossalicílico	89-57-6	1667	46.7	3429	Composto orgânico; Ácido carboxílico; Fenol
Acetaminofem	103-90-2	47.7	518	2163	Composto orgânico; amida
Acetonitrilo	75-05-8	7951	9528	3598	Composto orgânico; Nitrilo
Ácido acetilsalicílico	50-78-2	676	605	1506	Composto orgânico; Ácido carboxílico; Fenol
Aminopterina	54-62-6	0.006	669	7	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Amitriptilina HCl	549-18-8	7.05	8.96	34.8	Composto orgânico; Composto Policíclico
Trióxido de arsênico	1327-53-3	1.96	5.26	25	Composto inorgânico; Arsênico
Sulfato de Atropina	5908-99-6	76	81.8	81.9	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Ácido bórico	10043-35-3	1850	421	3426	Composto inorgânico; Composto de boro; Ácidos
Bussulfano	55-98-1	77.7	260	12	Hidrocarbonetos; Composto de enxofre
Cloreto de cádmio II	10108-64-2	0.518	1.84	135	Composto inorgânico; Composto de cádmio
Cafeína	58-08-2	153	638	310	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Carbamazepina	298-46-4	103	83.2	2805	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Tetracloreto de carbono	56-23-5	ND	ND	3783	Composto orgânico; Hidrocarboneto Halogenado

Produto Químico em teste	CASRN	3T3 NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	NHK NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	Referência para DL_{50} oral aguda[2,3]	Classe Química
Hidrato de cloral	302-17-0	183	133	638	Composto orgânico; Álcool
Cloranfenicol	56-75-7	128	348	3491	Composto orgânico; Álcool; Hidrocarboneto cíclico; Composto nitro
Ácido cítrico	77-92-9	796	400	5929	Composto orgânico; Ácido carboxílico
Colchicina	64-86-8	0.034	0.007	15 (camundongo)	Composto orgânico; Composto Policíclico
Sulfato cúprico penta-hidratado	7758-99-8	42.1	197	474	Composto inorgânico; Composto de enxofre; Metal
Cicloheximida	66-81-9	0.187	0.073	2	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Ftalato de dibutilo	84-74-2	49.7	28.7	8892	Composto orgânico; Ácido carboxílico
Diclorvos	62-73-7	17.7	10.7	59	Composto orgânico; Composto organofosforado
Ftalato de dietilo	84-66-2	107	120	9311	Composto orgânico; Ácido carboxílico
Digoxina	20830-75-5	466	0.001	28	Composto orgânico; Composto policíclico; Carboidrato
Dimetilformamida	68-12-2	52244	7760	5309	Composto orgânico; Amida; Ácido carboxílico
Diquomide diquomida monohidratada	6385-62-2	8,04	4,48	160	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Dissulfotom	298-04-4	133	270	5	Composto orgânico; Composto organofosforado; Composto de enxofre
Endosulfan	115-29-7	6,35	2,13	28	Composto orgânico; Composto Heterocíclico; Composto de enxofre
Bitartrato de epinefrina	51-42-3	59	87,4	4 (camundongo)	Composto orgânico; Álcool; Amina
Etanol	64-17-5	6523	10018	11324	Composto orgânico; Álcool

Produto Químico em teste	CASRN	3T3 NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	NHK NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	Referência para DL_{50} oral aguda[2,3]	Classe Química
Etilenoglicol	107-21-1	24317	41852	7161	Composto orgânico; Álcool
Enpropatrina	39515-41-8	24,2	2,43	76	Composto orgânico; Nitrilo; Éster; Éter
Ácido gibe-rélico	77-06-5	78105	2856	6040	Composto orgânico; Composto Policíclico
Glutetimida	77-21-4	174	174	600	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Glicerol	56-81-5	24655	24730	19770	Composto orgânico; Álcool
Haloperidol	52-86-8	6,13	3,36	330	Composto orgânico; Cetona
Hexaclorofeno	70-30-4	4,19	0,029	82	Composto orgânico; Hidrocarboneto cíclico; Fenol
Ácido lático	50-21-5	3044	1304	3639	Composto orgânico; Ácido carboxílico
Lindano	58-89-9	108	18,7	100	Composto orgânico; Hidrocarboneto Halogenado
Carbonato de Lítio I	554-13-2	5625	468	590	Composto inorgânico; Composto de lítio; Alquilos; Composto de carbono
Meprobamato	57-53-4	519	357	1387	Composto orgânico; Ácido carboxílico
Cloreto de mercúrio II	7487-94-7	4,12	5,8	40	Composto inorgânico; Composto de mercúrio; Composto de Cloro
Metanol	67-56-1	N D	15296	8710	Composto orgânico; Álcool
Nicotina	54-11-5	361	107	70	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Paraquat	1910-42-5	20,1	61,6	93	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Paratiom	56-38-2	37,4	30,3	6	Composto orgânico; Composto organo-fosforoso; Composto de enxofre
Fenobarbital	50-06-6	573	448	224	Composto orgânico; Composto heterocíclico

Produto Químico em teste	CASRN	3T3 NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	NHK NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	Referência para DL_{50} oral aguda[2,3]	Classe Química
Fenol	108-95-2	66,3	75	548	Composto orgânico; Fenol
Feniltioureia	103-85-5	79	336	3	Composto orgânico; Composto de enxofre; Uréia
Fisostigmina	57-47-6	25,8	88,5	5	Composto orgânico; Ácido carboxílico; Composto heterocíclico
Cloreto de potássio I	7447-40-7	3551	2237	2799	Composto inorgânico; Composto de potássio; Composto de Cloro
Procainamida HCl	51-06-9	441	1741	1950	Composto orgânico; Ácido carboxílico; amida
Propranolol	3506-09-0	13,9	35,3	466	Composto orgânico; Álcool; Amina; Composto Policíclico
Propilparabeno	94-13-3	26,1	16,6	6332 (camundongos)	Composto orgânico; Ácido carboxílico; Fenol
Arsenito de sódio	7784-46-5	0,759	0,477	44	Composto inorgânico; Arsenical; Composto de Sódio
Cloreto de sódio	7647-14-5	4730	1997	4046	Composto inorgânico; Composto de sódio; Composto de Cloro
Dihidrato de dicromato de sódio	7789-12-0	0,587	0,721	51	Composto inorgânico; Composto de sódio; Composto de cromo
Fluoreto de sódio	7681-49-4	78	49,8	127	Composto inorgânico; Composto de sódio; Composto de flúor
Hipoclorito de sódio	7681-52-9	1103	1502	10328	Composto inorgânico; Composto de sódio; Composto de oxigénio; Composto de Cloro
Oxalato de sódio	62-76-0	37,7	337	633	Composto orgânico; Ácido carboxílico; Composto de Sódio
Selenato de sódio	13413-01-0	29	10,2	3	Composto inorgânico; Composto de sódio; Composto de selênio

Produto Químico em teste	CASRN	3T3 NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	NHK NRU IC_{50} (μg/mL)[1]	Referência para DL_{50} oral aguda[2,3]	Classe Química
Estricnina	57-24-9	158	62,5	6	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Sulfato de Tálio I	7446-18-6	5,74	0,152	25	Composto inorgânico; Metal; Composto de enxofre
Ácido tricloroacético	76-03-9	902	413	5229	Composto orgânico; Ácido carboxílico
Trietilenomelamina	51-18-3	0,272	1,85	4	Composto orgânico; Composto heterocíclico
Hidróxido de ripeniltina	76-87-9	0,017	0,01	329	Composto orgânico; Composto organo-metálico
Ácido valpróico	99-66-1	916	512	995	Composto orgânico; Ácido carboxílico; Lipídios
Verapamil HCl	152-11-4	34,9	66,5	111	Composto orgânico; Amina
Xileno	1330-20-7	7215	4665	4667	Composto orgânico; Cíclico

Abreviaturas: 3T3 = fibroblastos BALB/c 3T3; CASRN = Número do Registro da Substância Química; NHK = Queratinócitos epidérmicos humanos normais; NRU = absorção de vermelho neutro; NA = Não disponível.

[1] Média geométrica dos valores médios geométricos do laboratório (três laboratórios, salvo indicação em contrário).
[2] Com base numa média geométrica de valores aceitáveis de DL50 de ratos de laboratório adultos, salvo indicação em contrário.
[3] Valores arredondados para o número inteiro mais próximo.
[4] Classificações químicas baseadas na classificação de Medical Subject Headings para substâncias químicas e drogas, desenvolvida pela National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html).
[5] Dados disponíveis em apenas um laboratório.
[6] Dados disponíveis em apenas dois laboratórios

Adotado: 17 de Dezembro de 2001

Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 420

Toxicidade oral aguda – procedimento de dose fixa

INTRODUÇÃO

1. Diretrizes OECD para Testes Químicos são periodicamente revisadas à luz do progresso científico ou das mudanças nas práticas de avaliação. A Diretriz 420, originalmente, foi adotada em julho de 1992 como o primeiro teste alternativo de toxicidade aguda convencional, descrito nos testes da Diretriz 401. Baseando-se nas recomendações de vários encontros de profissionais, uma revisão foi considerada adequada porque: i) foi feito um acordo internacional sobre os valores-limites harmonizados da DL50 para a classificação de substâncias químicas, que diferem dos valores de corte recomendados na versão da diretriz de 1992; e ii) agora é considerado suficiente testar somente em um sexo (geralmente em fêmeas).

2. Métodos tradicionais para avaliar toxicidade aguda usam a morte de animais como ponto de término. Em 1984, uma nova abordagem para testes de toxicidade aguda foi sugerida pela Sociedade Britânica de Toxicologia, baseada na administração em uma série de níveis de dose fixa[1]. A abordagem evitava a morte de animais, como ponto final do teste se baseava nas observações de sinais claros de toxicidade em um dos vários níveis de dose fixa. O procedimento foi adotado pelo Conselho como Diretriz de Teste em 1992, seguindo os estudos de validação *in vivo* – britânicos[2] e internacionais[3]. Subsequentemente, as propriedades estatísticas do procedimento de dose fixa foram avaliadas usando-se modelos matemáticos em uma série de estudos[4-6]. Juntos, os estudos *in vivo* e de modelagem demonstraram que o procedimento é replicável, usa menos animais, causa menos sofrimento do que os métodos tradicionais e consegue ranquear substâncias de maneira similar ao outro método de teste de toxicidade aguda (Diretrizes de Teste 423 e 425).

3. Orientação na seleção do método de teste mais apropriado para um determinado propósito pode ser encontrada no Documento de Orientação sobre Testes de Toxicidade Oral Aguda[7]. Esse Documento de Orientação também contém informação adicional sobre conduta e interpretação da Diretriz 420.

*4.*Definições usadas no contexto dessas diretrizes estão dispostas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

*5.*O postulado deste método é que apenas doses moderadamente tóxicas sejam utilizadas. Além disso, doses letais conhecidas por causar dor e angústia intensas, devido à corrosão ou à severa irritação, não precisam ser administradas.

Animais moribundos/ agonizantes ou animais obviamente com dor ou mostrando sinais de severa angústia devem ser eutanasiados (humanely killed – ou seja, morto de maneira benevolente), sendo considerados na interpretação dos resultados tanto quanto aqueles que morreram durante o teste. Os critérios para tomar a decisão de eutanasiar animais agonizantes ou em sofrimento severo e a orientação no reconhecimento de mortes previsíveis e iminentes são descritos em um Documento de Orientação[8] específico para esse fim.

6. O método fornece informação sobre as propriedades de risco, permitindo que a substância seja ranqueada e classificada de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS – Global Harmonization Systems) para classificação de produtos químicos causadores de toxicidade aguda[9].

7. O laboratório deve considerar toda informação disponível sobre a substância de teste antes de conduzir o estudo. Tais informações incluem a identidade e a estrutura química da substância; sua propriedade físico-química, os resultados de qualquer outro teste de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância, dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente relacionadas e o(s) uso(s) antecipado(s) da substância. Essas informações são necessárias para atender a todos os interessados quanto à relevância do teste para a proteção da saúde humana e ajudarão na definição de uma dose inicial apropriada.

Princípios do teste

8. Grupos de animais de um mesmo sexo são testados em um procedimento passo a passo, usando as doses fixas de 5, 50, 300 e 2.000mg/kg (excepcionalmente, uma dose fixa adicional de 5.000mg/kg pode ser considerada – veja parágrafo 19). A dose inicial é selecionada baseada em um estudo observacional para produzir alguns sinais de toxicidade, sem causar efeitos tóxicos severos ou mortalidade. Sinais clínicos e condições associadas à dor, ao sofrimento e à morte iminente são descritos em detalhes em um Documento de Orientação OECD em separado[8]. Outros grupos de animais podem ser testados num nível

de dose fixa maior ou menor, dependendo da presença ou da falta de sinais de toxicidade ou mortalidade. Esse procedimento continua até que se identifique a dose que cause evidente toxicidade, quando não se observar mais de uma morte, quando nenhum efeito for observado na dose maior ou quando a morte ocorrer na dose menor.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção de espécies de animais

9. A espécie roedora preferida é o rato, embora outras espécies de roedores possam ser utilizadas.

Habitualmente as fêmeas são escolhidas[7]. Isso porque pesquisas bibliográficas de testes convencionais de DL50 mostram que normalmente há pequena diferença na sensibilidade entre os sexos; nos casos nos quais diferenças são observadas, fêmeas são geralmente um pouco mais sensíveis[10]. Todavia, se o conhecimento das propriedades toxicológicas ou toxicocinéticas de produtos químicos estruturalmente relacionados indicarem que machos são mais sensíveis, então este sexo deve ser usado. Quando o teste é conduzido em machos, deve-se justificar a escolha.

10. Devem ser usados animais adultos jovens e saudáveis de espécie comumente usadas em laboratórios. Fêmeas devem ser nulíparas e não prenhas. Cada animal, na sua dose inicial, deve ter entre 8 e 12 semanas de idade e seu peso deve estar na faixa entre ±20% do peso médio de animais previamente testados.

Condições de acomodação e alimentação

11. A temperatura da sala de experimentação do animal deve ser 22°C (± 3°C). Embora a umidade relativa ideal seja entre 50 e 60%, deve-se observar o mínimo de 30% e, preferencialmente, não exceder 70% – a não ser que se esteja limpando o local. A luz deve ser artificial, usando a sequência de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Para alimentação, dietas convencionais de laboratório podem ser usadas, com abastecimento ilimitado de água. Animais podem ser mantidos em grupo por dose, mas o número de animais por caixa não deve interferir nas observações claras de cada animal.

Preparação de animais

12. Os animais são randomicamente selecionados, marcados, para permitir identificação individual, e mantidos em suas caixas por, no mínimo, 5 dias antes de se começar a dosagem, permitindo aclimatação às condições do laboratório.

Preparação das doses

13. Em geral, as substâncias de ensaio devem ser administradas em volume constante ao longo do intervalo de doses a serem testadas, variando a concentração da preparação da dose. No entanto, quando se pretende testar um produto final ou mistura líquida, a utilização da substância de ensaio não diluída – isto é, em concentração constante – pode ser relevante para a avaliação de risco posterior dessa substância, sendo um requisito de algumas autoridades regulatórias. Em qualquer um dos casos, o volume máximo de dose para administração não deve ser excedido. O volume máximo do líquido que pode ser administrado de uma vez depende do tamanho do animal em teste.

Em roedores, o volume normalmente não deve exceder 1ml/100g do peso corporal – embora, no caso de soluções aquosas, 2ml/100g do peso corporal possam ser considerados. Com respeito à formulação da preparação da dose, o uso de suspensão/emulsão/solução aquosa é recomendado, quando possível, seguido, em ordem de preferência, por solução/suspensão/emulsão em óleo (como óleo de milho) e, possivelmente, uma solução em outros veículos. Para outros veículos que não sejam a água, as características toxicológicas devem ser conhecidas. As doses devem ser preparadas pouco antes da administração – a menos que se conheçam suas estabilidades e estas sejam aceitáveis.

PROCEDIMENTO

Administração de doses

14. A substância de teste é administrada em uma única dose por sonda gástrica, usando um tubo gástrica ou uma cânula de intubação adequada. Na circunstância incomum de uma dose única não ser possível, a dose pode ser dada em frações menores por período que não exceda 24 horas.

15. Animais devem ser submetido a jejum antes da dosagem (ou seja: para o rato, jejum de comida, mas mantida a água, que deve ser retirada durante a noite;

para o camundongo, jejum de comida, mas não de água, que deve ser retirada por 3-4 horas). Após o período de jejum, os animais devem ser pesados e a substância em teste administrada. Após a administração da substância, a comida deve ser retirada por mais 3-4 horas, para ratos, e 1-2 horas, para camundongos. Quando a dose for administrada em frações por um período de tempo, pode ser necessário prover os animais com comida e água, dependendo da duração desse período.

Estudos de observação

16. O objetivo de um estudo observacional é permitir a definição de uma dose inicial apropriada para o estudo principal. A substância de teste é administrada em um único animal, de modo sequencial, seguindo o fluxograma do anexo 2. O estudo observacional é completado quando a dose inicial para o estudo principal for administrada (ou se a morte for observada na menor dose fixa).

17. A dose inicial para o estudo observacional é selecionada a partir dos níveis de dose fixa de 5, 50, 300 e 2.000mg/kg como uma dose esperada para produzir toxicidade baseada, quando possível, em evidências de dados *in vitro* ou *in vivo*, do mesmo produto químico ou para uma substância de estrutura relacionada. Na falta de tais informações, a dose inicial deve ser de 300mg/kg.

18. Será adotado período de, no mínimo, 24 horas entre as dosagens de cada animal. Todos os animais devem ser observados por, no mínimo, 14 dias.

19. Excepcionalmente, e apenas quando for justificado por necessidades regulatórias específicas, o aumento adicional na dose fixa, para nível acima de 5.000mg/kg, pode ser considerado (veja anexo 4). Por razões de bem-estar animal, testes em animais em categoria 5 no sistema GHS (2.000-5.000mg/kg) são desencorajados e devem ser considerados apenas quando há grande chance de tal teste ter relevância direta na proteção da saúde humana ou animal ou do meio ambiente.

20. Em um estudo observacional, em casos nos quais o animal testado venha a morrer nas doses mais baixas do que a dose fixa (5mg/kg), o procedimento normal é terminar o estudo e classificar a substância na categoria 1 do sistema GHS (como mostrado no anexo 2). Porém, se confirmações posteriores da classi-

ficação forem requeridas, um procedimento suplementar opcional pode ser conduzido, como segue. Um segundo animal é dosado em 5mg/kg. Se o segundo animal morrer, então a categoria 1 é confirmada e o estudo será imediatamente finalizado. Se o segundo animal sobreviver, três animais adicionais, no máximo, serão testados em 5mg/kg. Como há alto risco de mortalidade, esses animais devem ser testados de maneira sequencial, para proteger o bem-estar do animal. O intervalo de tempo de dosagem de cada animal deve ser o suficiente para se certificar que o animal anterior tenha chance de sobreviver. Se uma segunda morte ocorrer, a sequência de dosagem será imediatamente terminada e nenhum outro animal será testado. Devido à ocorrência de uma segunda morte (independentemente do número de animais testados no momento do término) cair no resultado A (2 ou mais mortes), deve se seguir a regra de classificação do anexo 3 em uma dose fixa de 5mg/kg (Categoria 1, se há duas ou mais mortes, ou categoria 2, se não há mais de uma morte).

ESTUDO PRINCIPAL

Número de animais e níveis de dosagem

21. A ação a ser tomada, depois do nível de dosagem inicial, está indicada no fluxograma do anexo 3. Uma de três ações será necessária: parar o teste e classificar apropriadamente o risco; testar uma dose fixa maior; testar uma dose fixa menor. Porém, para proteger os animais, um nível de dosagem letal em um estudo de observação não será aplicado novamente no estudo principal (veja anexo 3). A experiência mostrou que o resultado mais provável no nível de dosagem inicial será aquele no qual a substância pode ser classificada e nenhum teste posterior seja necessário.

22. No total, cinco animais do mesmo sexo serão normalmente usados para cada nível de dose investigada. O conjunto de animais será composto por um animal do estudo observacional testado no nível selecionado e mais quatro animais (exceto, excepcionalmente, se um nível de dose usado no estudo principal não tiver sido usado no estudo observacional).

23. O intervalo de tempo entre as dosagens de cada nível é determinado pelo aparecimento, pela duração e pela severidade dos sinais tóxicos. O tratamento de animais para a próxima dose será atrasado até se ter certeza da sobrevivência dos animais da dosagem anterior. O período de três ou quatro dias entre as do-

sagens de cada nível é recomendado, se necessário, para permitir a observação de toxicidade tardia. O intervalo de tempo pode ser ajustado conforme a necessidade, por exemplo, em caso de respostas inconclusivas.

24. Deve-se seguir o procedimento listado no anexo 4 (veja parágrafo 19) quando o uso de uma dose fixa superior a 5.000mg/kg for considerado.

Teste limite

25. O teste limite é usado principalmente em situações nas quais o operador tem informações indicando que o material de teste é provavelmente não tóxico, ou seja, tem toxicidade apenas acima das doses dos limites regulatórios. A informação sobre a toxicidade do material de teste pode ser obtida pelo conhecimento sobre produtos, compostos ou misturas testados, considerando a identidade e a porcentagem dos componentes conhecidos como sendo de significância toxicológica. Nas situações nas quais há pouca ou nenhuma informação sobre sua toxicidade, ou quando o material de ensaio é esperado ser tóxico, o teste principal deve ser feito.

26. Usando o procedimento normal, um estudo observacional com dose inicial de 2.000mg/kg (ou, excepcionalmente, 5.000mg/kg), seguido pela dosagem de mais quatro animais a esse nível, serve como um teste limite para esta Diretriz.

OBSERVAÇÕES

27. Animais são observados individualmente depois de testados; pelo menos uma vez, durante os primeiros 30 minutos; periodicamente, durante as primeiras 24 horas; com atenção especial, durante as primeiras 4 horas; e diariamente, depois disso, pelo total de 14 dias – exceto se os animais precisarem ser removidos do estudo e eutanasiados por questões de bem-estar animal ou se forem encontrados mortos. Porém, a duração da observação não deve ser fixada rigidamente. Ela deve ser determinada por reações tóxicas, tempo de aparecimento e duração dos períodos de recuperação e pode, por isso, ser estendida quando considerado necessário. Os tempos nos quais os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, especialmente se existe uma tendência de os sinais tóxicos serem tardios[11]. Todas as observações são sistematicamente registradas, sendo mantido registros individuais para cada animal.

28. Observações adicionais são necessárias se os animais continuarem a mostrar sinais de toxicidade. Comentários devem incluir mudanças na pele e no pelo, nos olhos e nas membranas mucosas; também as mudanças nos sistemas respiratório, circulatório, nervoso (central e autônomo), na atividade somatomotora e nos padrões de comportamento. Atenção deve ser dada à presença de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Os princípios e os critérios sumarizados no Documento de Orientação de Desfechos Humanizados devem ser considerados[8]. Animais encontrados moribundos/agonizantes e animais mostrando dor severa ou sinais de angústia severa e persistente devem ser eutanasiados. Quando animais são eutanasiados ou encontrados mortos, o horário de morte deve ser registrado o mais precisamente possível.

Peso corporal

29. O peso individual dos animais deve ser determinado pouco antes de a substância a ser testada ser administrada e, no mínimo, semanalmente depois disso. Mudanças de peso devem ser calculadas e registradas. No fim do teste, animais que sobreviveram são pesados e depois eutanasiados.

Patologia

30. Todos os animais de testes (incluindo aqueles que morreram durante o processo ou foram removidos do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser submetidos a uma autópsia completa. Todas as mudanças patológicas importantes devem ser registradas para cada animal. Exame microscópico de órgãos mostrando evidências de patologia importante em animais sobreviventes por 24 horas ou mais depois da dose inicial deve ser considerado, pois talvez produza informação útil.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

31. Dados individuais de cada animal devem ser fornecidos. Adicionalmente, todos os dados devem ser sumarizados em forma de tabelas, mostrando, para cada grupo de animais em teste, o número de animais que exibiram sinais de toxicidade, o número de animais encontrados mortos durante o teste ou eutanasiados, o horário da morte de cada animal, uma descrição, o tempo de efeitos tóxicos e reversibilidade e os resultados da autópsia.

Relatório do teste

32. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações, conforme apropriado:

Substância em teste:

- Natureza física, pureza e, quando relevante, propriedades físico-químicas (incluindo isomerização)
- Dados de identificação, incluindo número CAS

Veículos (se apropriado):

- Justificativa para o uso de veículos, caso não seja a água

Animais de teste:

- Espécies/raças usadas
- Status microbiológico do animal, se conhecido;
- Número, idade e sexo dos animais (incluindo, quando apropriado, um arrazoado para o uso de machos ao invés de fêmeas)
- Fonte, condições de acomodações, dieta, etc.

Condições do ensaio:

- Detalhes da formulação da substância teste, incluindo detalhes da forma física do material administrado
- Detalhes da administração da substância teste, incluindo volume da dosagem e tempo de dosagem
- Detalhes da qualidade de comida e água (incluindo tipo/fonte da dieta, fonte da água)
- A justificativa (racional) para a seleção da dose inicial

Resultados:

- Tabulação dos dados de resposta e nível de dosagem para cada animal (ou seja, animais que mostraram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, severidade e duração dos efeitos)
- Tabulação de peso corporal e suas mudanças

- Peso individual dos animais no dia de dosagem e em intervalos semanais depois disso, assim como na hora da morte ou eutanásia
- Data e horário da morte se ocorrer antes da (eutanásia) programada
- Tempo de início de aparecimento de sinais tóxicos e se eles foram reversíveis para cada animal
- Dados histopatológicos ou encontrados na autópsia de cada animal (se disponível)

Discussão e interpretação dos resultados.

Conclusões.

LITERATURA

1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. HumanToxicol., 3,85-92.

2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6,279-291.

3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Fd. Chem. Toxicol., 28,469-482.

4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30,313-324.

5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol., 14,315-323.

6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2000). Statistical evaluation of modifications to the fixed dose procedure (manuscript in preparation).

7) OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment. No.24.

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on

Testing and Assessment. No19.

9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28thJoint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party onChemicalsinNovember1998,Part2,p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24- no-0,FF.html].

10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol., 33,223-231.

11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ANEXO 1

Definições

Toxicidade Oral Aguda: refere-se àquelas ocorrências de efeitos adversos que seguem a administração oral de uma única dose da substância ou de múltiplas doses administradas no intervalo de 24 horas.

Morte retardada: significa que um animal não morreu, nem parece moribundo em 48 horas, mas morreu depois desse período, durante o intervalo de observação de 14 dias.

Dose: é a quantidade de substância de teste administrada. A dose é expressa pelo peso da substância em teste por unidade de peso do animal do ensaio (por exemplo, mg/kg)

Toxicidade evidente: é um termo geral para descrever sinais claros de toxicidade que seguem a administração da substância teste (veja Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). A validação internacional de procedimentos de dose a fixa como uma alternativa ao teste DL clássico (Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482[3] para exemplos), de modo que se pode esperar por dor severa ou sinais persistentes

de angústia severa, estado moribundo/agonizante (critérios apresentados no Documento de Orientação de Desfechos Humanizados[8]) ou provável mortalidade.

GHS: Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Uma atividade em conjunto da OECD (Saúde Humana e Meio Ambiente), Comitê de Peritos da ONU sobre Transporte e Mercadorias Perigosas (propriedades físico-químicas) e ILO (Comunicação de riscos), coordenado pelo Programa Interorganizacional para o Gerenciamento Seguro de Substâncias Químicas (IOMC).

Morte iminente: quando estado agonizante ou morte é esperado antes do próximo momento planejado de observação. Sinais que indicam esse estado, em roedores, podem incluir convulsões, posição lateral, ficar deitado e tremor (veja o Documento de Orientação de Desfechos Humanizado [8]).

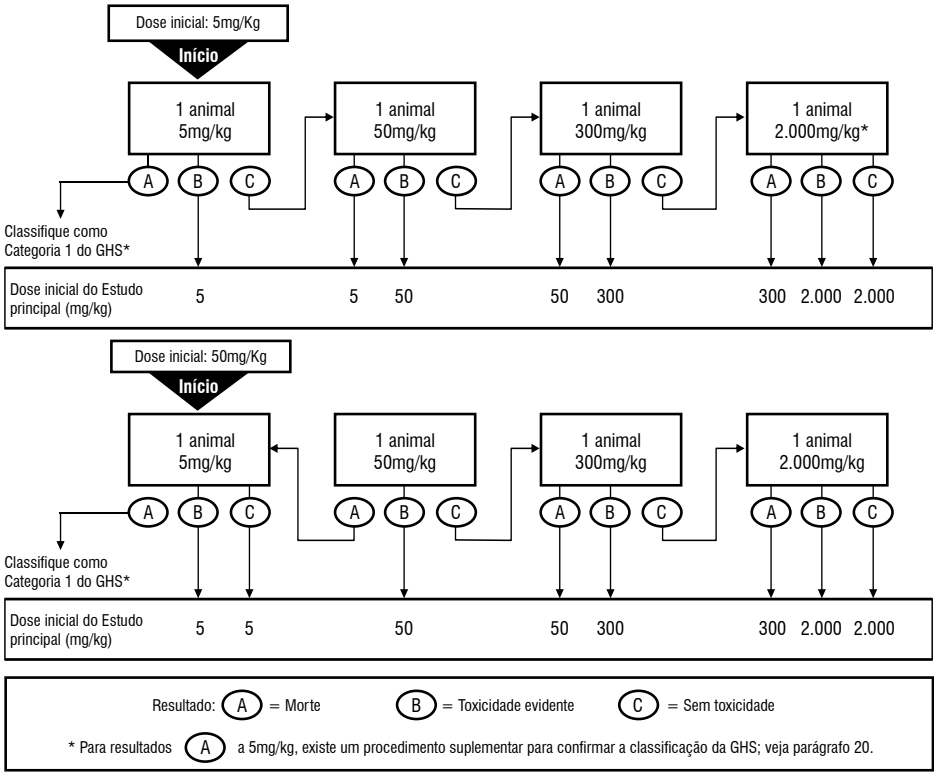
DL50: dose oral letal média, de origem estatística, é uma dose única de uma substância da qual se espera que cause a morte de 50% dos animais, quando administrada via oral. O valor DL50 é expresso em termos de peso da substância sobre a unidade de peso do animal de teste (mg/kg).

Dose limite: se refere à dose de um limite superior para testes (2.000 ou 5.000 mg/kg).

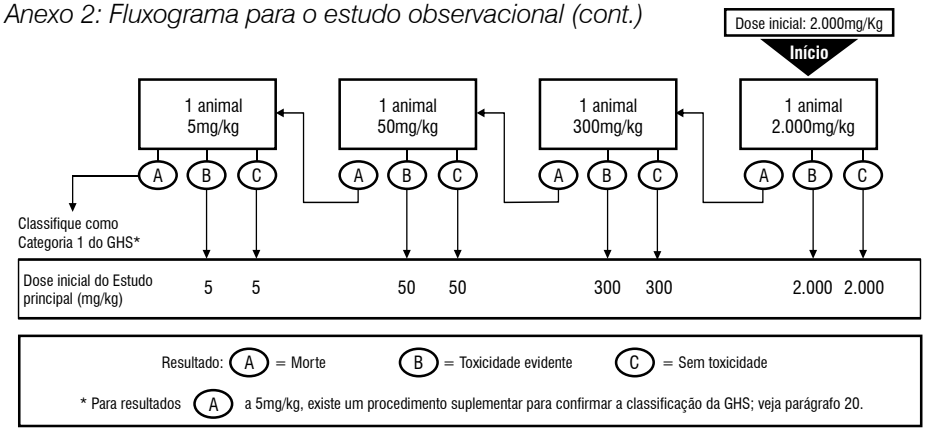
Estado moribundo/agonizante: significa estar próximo à morte ou ser incapaz de sobreviver, mesmo se tratado (veja o Documento de Orientação para Desfechos Humanizados[8] para mais detalhes).

Morte previsível: é a presença de sinais clínicos indicando a morte em horário conhecido no futuro antes do final planejado do experimento; por exemplo: a incapacidade de alcançar água ou comida. (veja o Documento de Orientação para Desfechos Humanizados[8] para mais detalhes).

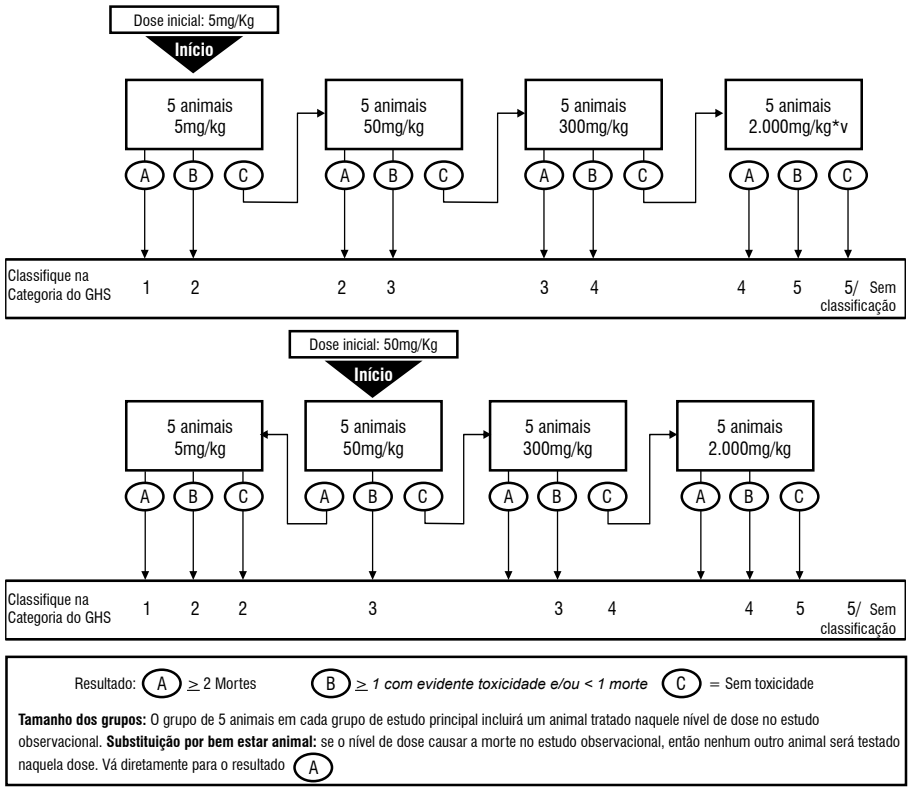
Anexo 2: Fluxograma para o estudo observacional

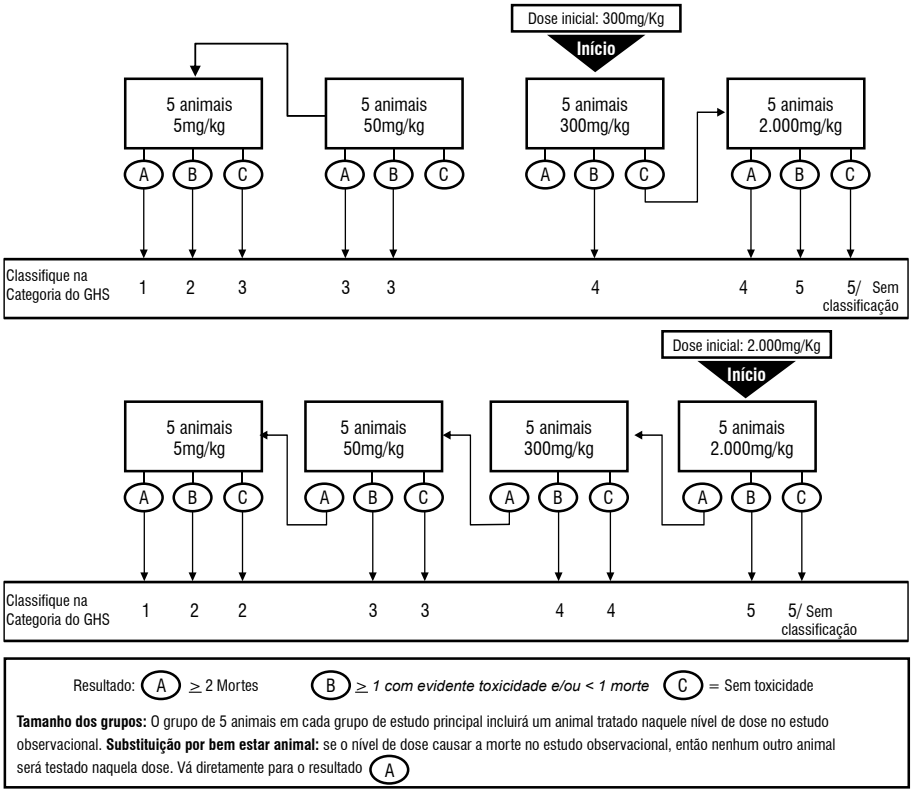


Anexo 2: Fluxograma para o estudo observacional (cont.)



Anexo 3: Fluxograma para o estudo observacional





ANEXO 4

Critérios para classificação de substâncias em teste com valor DL50 esperado excedendo 2.000Mg/kg sem precisar testar

1. Os critérios para categoria de risco 5 destinam-se a permitir a identificação de substâncias de testes que têm relativamente baixo risco de toxicidade aguda, mas que, sob certas circunstâncias, talvez apresentem perigo para populações vulneráveis. Prevê-se, para estas substâncias, um DL50 oral ou dérmico entre 2.000 e 5.000mg/kg ou doses equivalentes por outras vias. A substância teste pode ser classificada na categoria de risco definida por 2.000mg/kg <DL50<5.000mg/kg (Categoria 5 no GHS) nos seguintes casos:

A. Se direcionadas a essa categoria por meio de um esquema de testes do anexo 3, baseado em incidência de morte;

B. Se há evidência confiável disponível indicando que o DL50 está na faixa de valores da categoria 5; ou se outro estudo de efeitos tóxicos em animais ou humanos indicar uma preocupação com saúde humana de natureza aguda;

C. Por extrapolação, estimativa ou tomada/obtenção dados se uma atribuição a outra categoria de risco mais alta não se justificar e se:

- Informação confiável estiver disponível, indicando efeitos tóxicos significativos em humanos, ou
- Alguma mortalidade for observada quando testada com valores de categoria 4 por via oral, ou
- Quando julgamento de peritos confirmarem sinais clínicos e significativos de toxicidade quando testados sob valores de categoria 4, exceto diarreia, pilo-ereção ou aparência ruim/desarrumada, ou
- Quando o julgamento de um especialista confirmar informações confiáveis indicando o potencial para efeito agudo significante por outro estudo com animais.

TESTANDO DOSES ACIMA DE 2.000mg/kg

2. Excepcionalmente, e apenas quando justificado por necessidades regulatórias específicas, o uso de aumento adicional do nível de dose fixa para 5.000mg/kg pode ser considerado. Reconhecendo-se a necessidade de proteger o bem-estar animal, testar em 5.000mg/kg é desencorajado e deveria ser considerado apenas quando há forte probabilidade de os resultados de teste terem relevância direta na proteção da saúde humana ou animal[9].

ESTUDO DE OBSERVAÇÃO

3. As regras de decisão que regem o procedimento sequencial presente no anexo 2 são ampliadas para incluir um nível de dosagem de 5.000mg/kg. Assim, num estudo observacional, quando a dose inicial de 5.000mg/kg produzir o resultado A (morte), será necessário que um segundo animal seja testado a 2.000mg/kg;

os resultados B e C (toxicidade evidente ou sem toxicidade) permitirão a seleção de 5.000mg/kg como principal dose inicial do estudo. Do mesmo modo, se for utilizada dose inicial diferente de 5.000mg/kg, no caso de resultados B ou C a 2.000mg/kg, o teste progredirá para 5.000mg/kg; um resultado A de 5.000mg/kg (como dose inicial) determinará uma dose inicial de 2.000mg/kg no estudo principal e os resultados B e C determinarão a dose inicial de 5.000mg/kg no estudo principal.

Estudo Principal

4. As regras de decisão que regem o procedimento sequencial apresentado no anexo 3 são ampliadas para incluir um nível de dosagem de 5.000mg/kg. Portanto, quando um estudo principal começar com dose de 5.000mg/kg, o resultado A (duas mortes ou mais) exigirá o teste de um segundo grupo em 2.000mg/kg; o resultado B (toxicidade evidente e/ou menor ou igual a uma morte) ou C (sem toxicidade) resultará na não classificação da substância de acordo com o GHS. Do mesmo modo, se for utilizada uma dose inicial diferente de 5.000mg/kg, o teste progredirá para 5.000mg/kg, no caso do resultado C a 2.000mg/kg; um resultado A posterior de 5.000mg/kg resultará na atribuição da substância à categoria 5 do GHS e os resultados B ou C levarão à não classificação da substância.

Adotado: 17 de Dezembro de 2001

Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 423

Toxicidade oral aguda – método de classe de toxicidade aguda

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas são periodicamente revisadas à luz do progresso científico ou da mudança das práticas de avaliação. A Diretriz 423 original foi adotada em março de 1996 como a segunda alternativa para o teste de toxicidade aguda convencional, descrito na Diretriz 401. Baseando-se nas recomendações de várias reuniões com peritos, uma revisão foi considerada pertinente, porque: i) se chegou a um acordo internacional nos valores de corte de DL50 harmonizados para a classificação de substâncias químicas, os quais diferem dos valores de corte recomendados na versão da diretriz de 1996, e ii) testar somente em um sexo (geralmente em fêmeas) agora é considerado suficiente.

2. O método de classe de toxicidade aguda[1], estabelecido nesta diretriz, é um procedimento passo a passo, com o uso de três animais de um mesmo sexo por passo. Dependendo da mortalidade e/ou do estado terminal desses animais, em média 2-4 passos podem ser necessários para permitir o melhor julgamento da toxicidade aguda da substância teste. Esse procedimento é reproduzível, usa poucos animais e é capaz de ranquear substâncias de maneira similar à de outros métodos de testes de toxicidade aguda (Diretrizes 420 e 425). O método de classe de toxicidade aguda é baseado em avaliações biométricas[2-5] com doses fixas, adequadamente separadas, permitindo que a substância seja ranqueada para propósitos de classificação e avaliação de risco. O método, como o adotado em 1996, foi extensamente validado *in vivo* contra dados de DL50 obtidos na literatura, tanto nacional[6], quanto internacionalmente[7].

3. Orientação na seleção do método de teste mais apropriado para um determinado propósito pode ser encontrada no Documento de Orientação sobre Testes de Toxicidade Oral Aguda[8]. Esse documento de orientação também contém informação adicional sobre conduta e interpretação da Diretriz 423.

4. Definições usadas no contexto destas diretrizes estão estabelecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. Substâncias testes, em doses conhecidas por causar grande dor e angústia devido à corrosão ou irritações severas, não precisam ser administradas. Animais terminais ou animais obviamente com dor ou mostrando sinais de severa angústia devem ser eutanasiados e serão considerados, na interpretação dos resultados dos testes, do mesmo modo que os mortos durante o procedimento. Critérios para tomar a decisão de matar animais terminais ou em sofrimento severo e orientação no reconhecimento de mortes previsíveis e iminentes são o assunto de um Documento de Orientação em separado[9].

6. O método usa doses pré-definidas e os resultados permitem que a substância seja ranqueada e classificada de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS) para a classificação de produtos químicos que causam toxicidade aguda[10].

7. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo de DL50, mas permite a determinação de faixas de exposição definidas onde a letalidade é esperada, já que a morte de uma parte dos animais ainda é o principal desfecho do teste. O método permite a determinação de um valor DL50 apenas quando pelo menos duas doses resultam em mortalidade maior do que 0% e menor do que 100%. O uso de uma seleção pré-definida de doses, independentemente da substância teste, com classificação explicitamente ligada ao número de animais observados em diferentes estados aumenta a oportunidade, para o laboratório, de replicabilidade e consistência de relatórios.

8. O estudo deverá considerar toda informação disponível da substância de teste antes de conduzir o ensaio. Tais informações incluem a identidade e a estrutura química da substância; suas propriedades físico-químicas, os resultados de qualquer outro teste de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância, os dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente relacionadas e o antecipado uso da substância. Essa informação é necessária para comprovar, a todos os interessados, que o teste é relevante para a proteção da saúde humana e irá ajudar na seleção de uma dose inicial apropriada.

PRINCÍPIOS DO TESTE

9. É princípio do teste que, baseando-se em um procedimento detalhado, com o uso de número mínimo de animais para cada passo, se obtenha informação suficiente sobre a toxicidade aguda da substância teste para permitir sua classificação. A substância é administrada oralmente, em um grupo de cobaias, com uma das doses definidas. A substância é testada usando um procedimento detalhado; cada passo usando três animais de um único sexo (geralmente fêmeas). A falta ou a presença de mortalidade de animais testados, relacionada aos compostos em um passo, determinará o próximo passo, ou seja:

- Não serão necessários mais testes.
- Dosagem de mais três animais, com a mesma dose.
- Dosagem de mais três animais ao próximo nível de dose maior ou menor.

10. Detalhes do procedimento do teste estão descritos no anexo 2. O método permitirá o julgamento com respeito à classificação da substância teste em uma das classes definidas pelo valor de corte fixo DL50.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção da espécie animal

11. A espécie roedora preferida é o rato, embora outras espécies de roedores possam ser utilizadas. Normalmente, fêmeas são usadas[9]. Isso porque pesquisas bibliográficas de testes convencionais de DL50 mostram que, embora geralmente haja pequena diferença na sensibilidade entre os sexos; nos casos onde diferenças são observadas, fêmeas são ligeiramente mais sensíveis[11]. Todavia, se o conhecimento das propriedades toxicológicas ou toxicocinéticas de produtos químicos estruturalmente relacionados indicarem que machos são mais sensíveis, então este sexo deve ser usado. Quando o teste é conduzido em machos, devem ser fornecidas justificativas adequadas.

12. Animais adultos jovens e saudáveis, de espécie comumente usadas em laboratório, devem ser utilizados. Fêmeas devem ser nulíparas (que nunca pariram) e não grávidas. Cada animal, na sua dose inicial, deve ter entre 8 e 12 semanas de

idade e seu peso deve estar no intervalo entre ±20% do peso médio de animais previamente testados.

Condições de acomodação e alimentação

13. A temperatura da sala experimental do animal deve estar em 22°C (±3°C). Embora a umidade relativa ideal seja entre 50 e 60%, deve-se observar o mínimo de 30% e preferencialmente não exceder 70%, a não ser que se esteja limpando o local. A luz deve ser artificial, usando a sequência de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Para alimentação, dietas convencionais de laboratório podem ser usadas com abastecimento ilimitado de água. Animais podem ser colocados em grupo nas caixas, por dose, mas o número de animais por caixa não deve interferir nas observações claras de cada animal.

Preparação de animais

14. Os animais são randomicamente selecionados, marcados, para permitir identificação individual, e mantidos em suas caixas por, no mínimo, 5 dias antes de se começar a dosagem, permitindo aclimatação às condições do laboratório.

Preparação das doses

15. Em geral, substâncias de testes devem ser administradas em um volume constante ao longo do intervalo das doses a serem testadas, variando a concentração da preparação da dose. No entanto, quando se pretende testar um produto final líquido ou mistura líquida, a utilização da substância de ensaio não diluída, isto é, a uma concentração constante, pode ser relevante para a avaliação de risco posterior dessa substância, sendo um requisito de algumas autoridades. Em qualquer um dos casos, o volume máximo de dose para administração não deve ser excedido. O volume máximo do líquido que pode ser administrado de uma vez depende do tamanho do animal de teste. Em roedores, o volume normalmente não deve exceder 1ml/100g do peso corporal: embora, no caso de soluções aquosas, 2ml/100g do peso corporal podem ser considerados. Com respeito à formulação da preparação da dose, o uso de suspensão/emulsão/solução aquosa é recomendado, quando possível, seguido, em ordem de preferência, por solução/suspensão/emulsão em óleo (como óleo de milho) e, então, possivelmente uma solução com outros tipos de solventes. Para soluções diferentes de água, as características toxicológicas devem ser conhecidas. As doses devem ser preparadas pouco antes da administração, a não ser que a estabilidade da preparação, durante o período que for utilizada, seja conhecida e demonstrada como aceitável.

PROCEDIMENTO

Administração de doses

16. A substância teste é administrada em dose única, por sonda gástrica, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. Na circunstância incomum de a dose única não ser possível, a dose pode ser dada em frações menores, por período que não exceda 24 horas.

17. Animais devem estar em jejum antes da dosagem (ou seja, com o rato, jejum de comida, mas não água – que deve ser retirada durante a noite; com o camundongo, comida, mas não água – que deve ser retirada por 3-4 horas). Seguindo o período de jejum, os animais devem ser pesados e a substância teste administrada. Após a administração da substância, a comida deve ser retirada por mais 3-4 horas, para ratos, e 1-2 horas, para camundongos. Quando a dose é administrada em frações, pode ser necessário prover os animais com comida e água, dependendo da duração desse período.

Número de animais e nível de dosagem

18. Três animais são usados em cada passo. Um nível da dose usada no início do ensaio é selecionado dentre os quatro níveis fixos: 5, 50, 300 e 2.000mg/kg de peso corporal. O nível de dosagem inicial deve ser aquele mais provável de produzir mortalidade em alguns dos animais testados. O fluxograma do anexo 2 descreve o procedimento que deve ser seguido para cada uma das doses iniciais.

19. Quando informação disponível sugerir que a mortalidade é improvável no nível mais alto de dosagem inicial (2.000mg/kg de peso corporal), então um teste limite deve ser conduzido. Quando não há informação sobre a substância a ser testada, pelo bem-estar animal, é recomendada a dose inicial de 300mg/kg de peso corporal.

20. O intervalo de tempo entre as dosagens de cada nível é determinado pelo aparecimento, pela duração e pela severidade dos sinais tóxicos. Tratamento de animais para a próxima dose deverá ser atrasado até se ter certeza da sobrevivência dos animais da dosagem anterior.

21. Excepcionalmente, e apenas quando for justificado por necessidades regulatórias específicas, o uso de aumento adicional na dose fixa para o nível de

5.000mg/kg pode ser considerado (veja anexo 3). Por razões de bem-estar animal, testes em animais em categoria 5 no sistema GHS (2.000-5.000mg/kg de peso corporal) são desencorajados e devem ser considerados apenas quando há grande chance de tal teste ter relevância direta para proteção da saúde humana, animal ou do meio ambiente.

Teste limite

22. O teste limite é principalmente usado em situações nas quais o pesquisador tem informações indicando que o material de teste é provavelmente não tóxico, isto é, tem toxicidade apenas acima de doses limites regulatórias. Informações sobre a toxicidade do material de teste podem ser obtidas através de dados sobre produtos, compostos ou misturas ou produtos de testes similares, levando-se em consideração a identidade e a porcentagem dos componentes conhecidos por terem significância toxicológica. Naquelas situações nas quais há pouca ou nenhuma informação sobre sua toxicidade, ou quando espera-se que o material teste seja tóxico, o teste principal deve ser feito.

23. Um teste limite ao nível de dosagem de 2.000mg/kg de peso corporal pode ser realizado com seis animais (três em cada passo). Excepcionalmente, um teste limite de nível de dosagem de 5.000mg/kg pode ser testado com três animais (ver anexo 3). Se houver mortalidade relacionada à substância teste, serão necessários testes posteriores ao nível da dosagem anterior utilizada.

OBSERVAÇÕES

24. Animais são observados individualmente depois de testados, no mínimo, uma vez durante os primeiros 30 minutos; periodicamente, durante as primeiras 24 horas; com atenção especial, durante as primeiras 4 horas; e diariamente depois disso, pelo total de 14 dias – exceto se os animais precisarem ser removidos do estudo e eutanasiados, por questões de bem-estar animal, ou se forem encontrados mortos. Porém, a duração da observação não deve ser rigidamente fixada. Ela deve ser determinada por reações tóxicas, tempo de aparecimento e duração de períodos de recuperação e pode, assim, ser estendida quando necessário. Os períodos de tempo quando sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, especialmente se há tendência de os sinais tóxicos serem tardios[12]. Todas as observações serão sistematicamente anotadas, com registros individuais mantidos para cada animal.

25. Observações adicionais são necessárias se os animais continuarem a mostrar sinais de toxicidade. Comentários devem incluir alterações na pele e no pelo, nos olhos e nas membranas mucosas e também nos sistemas respiratório, circulatório, além de nos sistemas nervosos central e autônomo e na atividade somatomotora e de padrões de comportamento. Atenção deve ser dada à análise de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Os princípios e critérios sumarizados no Documento de Orientação de Desfechos Humanos devem ser considerados[9]. Animais encontrados em condição terminal e animais com dor severa ou com sinais de sofrimento severo e persistente devem ser eutanasiados. Quando os animais são eutanasiados ou encontrados mortos, o horário de morte deve ser registrado o mais precisamente possível.

Peso corporal

26. O peso individual dos animais deve ser determinado pouco antes da substância de teste ser administrada e, no mínimo, semanalmente. Mudanças de peso devem ser calculadas e registradas. No fim do teste, animais que sobreviveram são pesados e depois eutanasiados.

Patologia

27. Todos os animais de testes (incluindo aqueles que morreram durante o teste ou foram removidos do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser sujeitados à autópsia completa. Todas as grandes mudanças patológicas de cada animal devem ser registradas. Exame microscópico de órgãos, mostrando evidências de grande patologia em animais sobreviventes por 24 horas ou mais, deve ser considerado, pois talvez produza informações úteis.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

28. Dados individuais de cada animal devem ser fornecidos. Adicionalmente, todos os dados devem ser sumarizados em forma de tabelas, registrando, para cada grupo de animais de teste usados: o número de animais que mostraram sinais de toxicidade; o número de animais encontrados mortos durante o teste ou mortos por eutanásia; o horário da morte de cada animal; uma descrição dos efeitos tóxicos, sua duração e reversibilidade, além de resultados da autópsia.

Relatório do teste

29. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações, conforme apropriado:

- Substância de teste:
  - Natureza física, pureza e, quando relevante, propriedades físico-químicas (incluindo isomerização)
  - Dados de identificação, incluindo número CAS
  - Veículos (se apropriado):
  - Justificativa para o uso de soluções que não seja a água
- Animais de teste:
  - Espécies/raças usadas
  - Status microbiológico do animal, se conhecido
  - Número, idade e sexo dos animais (incluindo, quando apropriado, uma razão para o uso de machos ao invés de fêmeas)
  - Fonte, condições de acomodações, dieta, etc.
- Condições do teste:
  - Detalhes da formulação da substância teste, incluindo detalhes da forma física do material administrado
  - Detalhes da administração da substância teste, incluindo volume e tempo de dosagem.
  - Detalhes da qualidade de comida e água (incluindo fonte da dieta da água)
  - A razão para a seleção da dose inicial
- Resultados:
  - Tabulação dos dados de resposta e nível de dosagem para cada animal (isto é, animais mostrando sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, severidade e duração dos efeitos)
  - Tabulação do peso corporal e suas mudanças
  - Peso individual de cada animal, no dia de dosagem e semanalmente, assim como na hora da morte ou da eutanásia
  - Data e horário da morte, se ocorrer antes da eutanásia programada
  - Tempo de início de sinais tóxicos e se são reversíveis para cada animal

  - Dados histopatológicos ou encontrados na autópsia de cada animal (se disponíveis)
- Discussão e interpretação dos resultados
- Conclusões

LITERATURA

(1) Roll R., Höfer-BosseTh. AndKayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31,86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32,336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. andSchlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68,559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69,729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX 16,129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute- Toxic-Class Method – An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66,455-470.

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69,659-670.

(8) OECD (2000) Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No24.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed

by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33,223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

ANEXO 1

Definições

Toxicidade Oral Aguda: refere-se àquelas ocorrências de efeitos adversos que seguem a administração oral de dose única da substância, ou múltiplas doses administradas no intervalo de 24 horas.

Morte retardada: significa que um animal não morreu, nem parece em estado terminal em 48 horas, mas morreu depois desse período, durante o intervalo de observação de 14 dias.

Dose: é a quantidade de substância de teste administrada. Dose é expressa pelo peso da substância de teste por unidade de peso do animal de teste (por exemplo: mg/kg).

GHS: Sistema Harmonizado de Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Uma atividade em conjunto da OECD (Saúde Humana e Meio Ambiente), Comitê de Peritos da ONU sobre Transporte de Produtos Perigosos (propriedades físico-químicas) e ILO (Comunicação de riscos), coordenado pelo Programa Interorganizacional para o Gerenciamento Seguro de Produtos Químicos (IOMC).

Morte iminente: quando o estado agonizante ou morte é esperado antes do próximo momento planejado de observação. Sinais que indicam esse estado em

roedores podem incluir convulsões, posição lateral, deitado e tremor (veja o Documento de Orientação de Desfechos Humanos[8]).

DL50: (dose oral letal média), de origem estatística, é uma dose única de uma substância da qual se espera que cause a morte de 50% dos animais quando administrada via oral. O valor DL50 é expresso em termos de peso da substância sobre a unidade de peso do animal de teste (mg/kg).

Dose limite: se refere à dose de um limite superior para testes (2.000 ou 5.000mg/kg).

Estado terminal: significa estar morrendo ou ser incapaz de sobreviver, mesmo se tratado (Veja o Documento de Orientação para Desfechos Humanos[9] para mais detalhes).

Morte previsível: é a presença de sinais clínicos indicando a morte em horário conhecido no futuro, antes do final planejado do experimento; por exemplo, a incapacidade de alcançar água ou comida (Veja o Documento de Orientação para Desfechos Humanos[9] para mais detalhes).

ANEXO 2

Procedimento a ser seguido para cada dose inicial

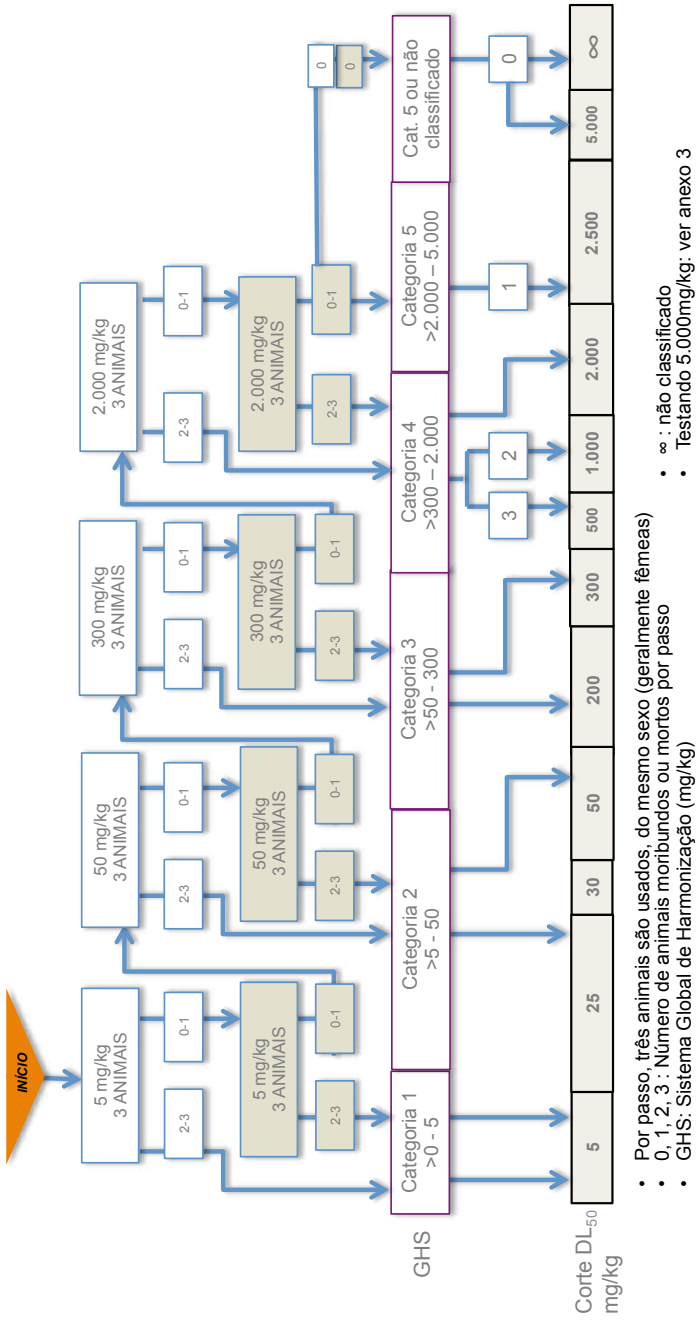
OBSERVAÇÕES GERAIS

1. Para cada dose inicial, o respectivo esquema de teste, como incluído neste anexo, deve ser seguido:

- Anexo 2 a: Dose inicial é 5mg/kg de peso corporal
- Anexo 2 b: Dose inicial é 50mg/kg de peso corporal
- Anexo 2 c: Dose inicial é 300mg/kg de peso corporal
- Anexo 2 d: Dose inicial é 2.000mg/kg de peso corporal

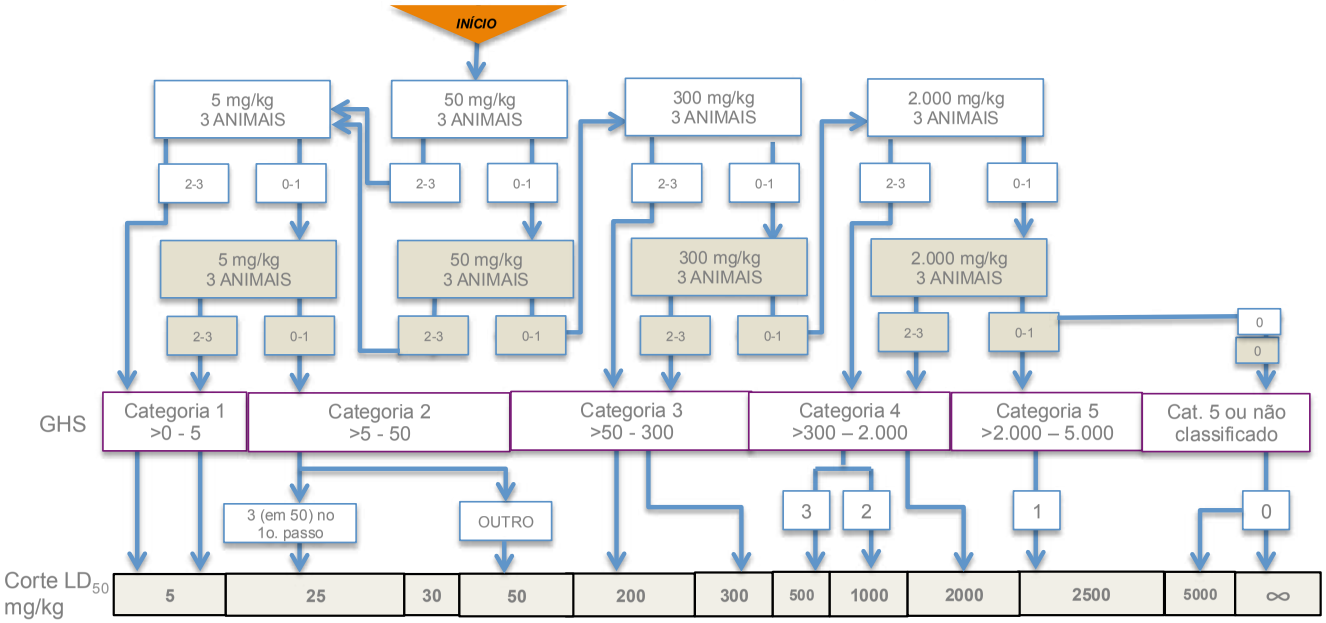
Dependendo do número de animais encontrados ou eutanasiados, o procedimento de teste segue as setas indicativas.

Anexo 2a: PROCEDIMENTO DE TESTE COM DOSE INICIAL DE 5mg/kg DE PESO CORPORAL



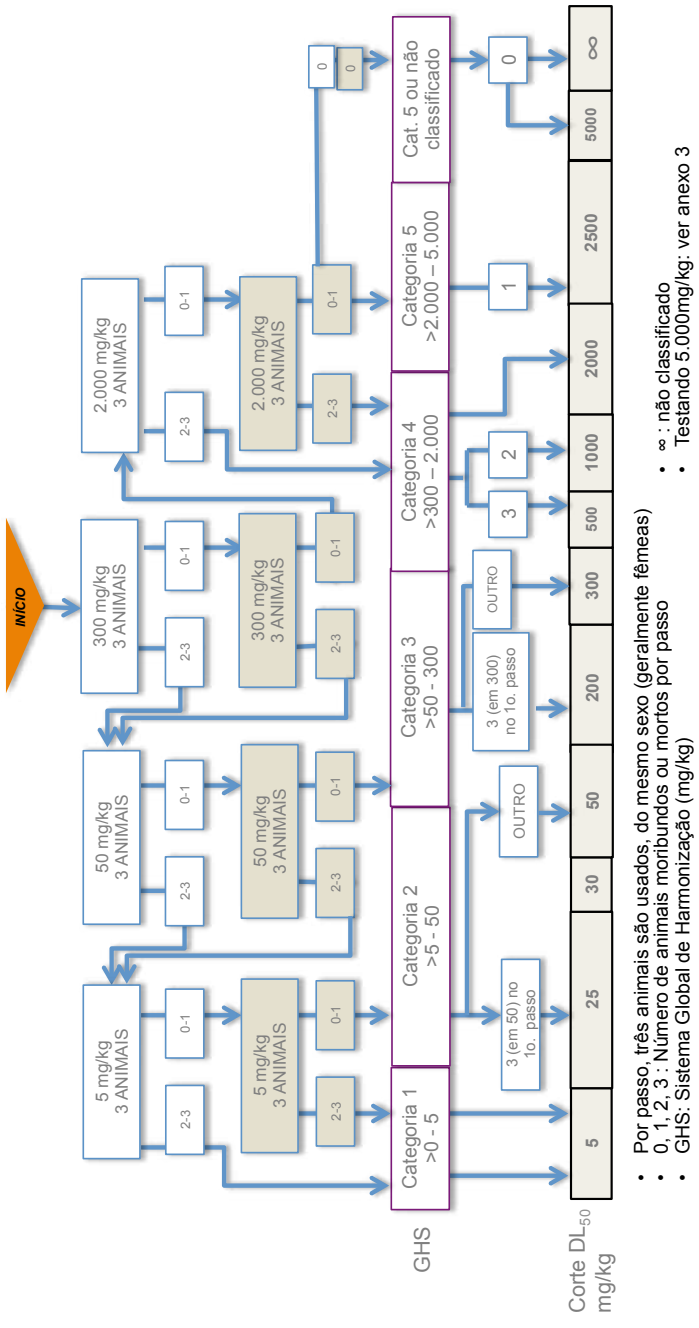
- Por passo, três animais são usados, do mesmo sexo (geralmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3 : Número de animais moribundos ou mortos por passo
- GHS: Sistema Global de Harmonização (mg/kg)
- ∞ : não classificado
- Testando 5.000mg/kg: ver anexo 3

Anexo 2b: PROCEDIMENTO DE TESTE COM DOSE INICIAL DE 50mg/kg DE PESO CORPORAL



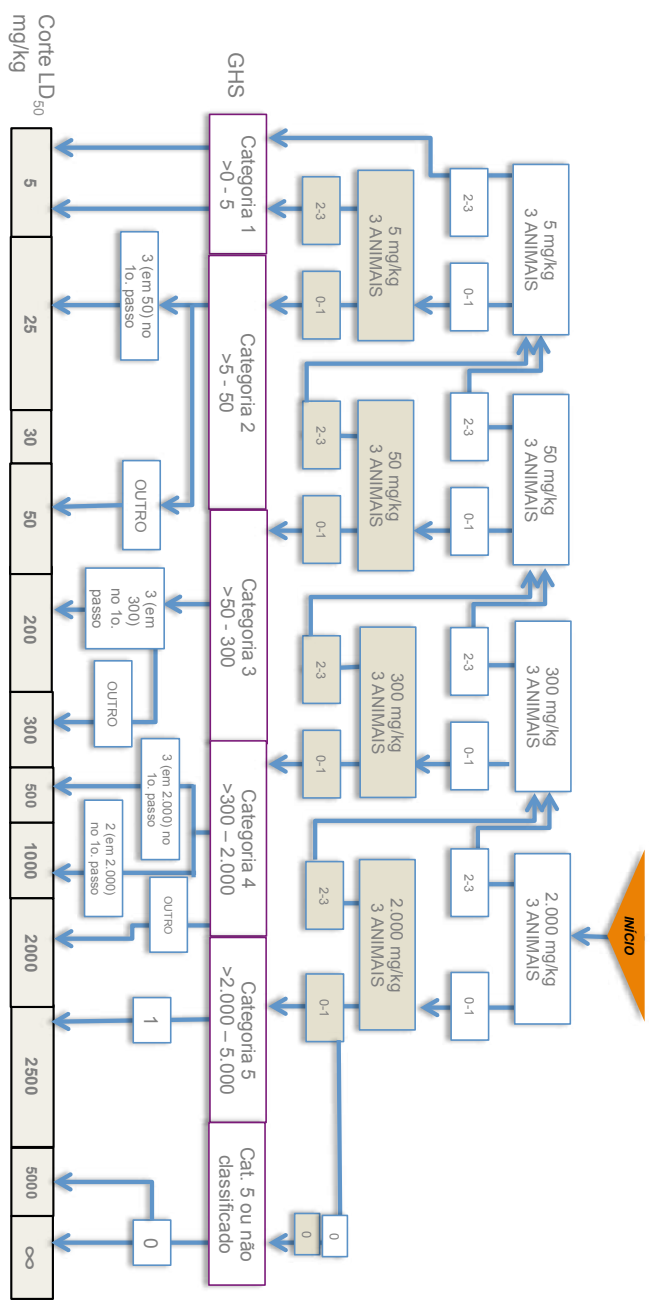
- Por passo, três animais são usados, do mesmo sexo (geralmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3 : Número de animais moribundos ou mortos por passo
- GHS: Sistema Global de Harmonização (mg/kg)
- ∞ : não classificado
- Testando 5.000mg/kg: ver anexo 3

Anexo 2c: PROCEDIMENTO DE TESTE COM DOSE INICIAL DE 300mg/kg DE PESO CORPORAL



- Por passo, três animais são usados, do mesmo sexo (geralmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3 : Número de animais moribundos ou mortos por passo
- GHS: Sistema Global de Harmonização (mg/kg)
- ∞ : não classificado
- Testando 5.000mg/kg: ver anexo 3

Anexo 2d: PROCEDIMENTO DE TESTE COM DOSE INICIAL DE 2.000mg/kg DE PESO CORPORAL



- Por passo, três animais são usados, do mesmo sexo (geralmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3 : Número de animais moribundos ou mortos por passo
- GHS: Sistema Global de Harmonização (mg/kg)
- ∞ : não classificado
- Testando 5.000mg/kg: ver anexo 3

ANEXO 3

Critérios para classificação de substâncias de teste com valor esperado DL50 excedendo 2.000Mg/kg sem precisar testar

1. Critérios para categoria 5 de risco destinam-se a permitir a identificação de substâncias de testes que tenham relativamente baixo risco de toxicidade aguda, mas que, sob certas circunstâncias, talvez apresentem perigo para populações vulneráveis. Essas substâncias são previstas para ter DL50 oral ou dérmica entre 2.000 e 5.000mg/kg ou doses equivalentes por outras vias. A substância teste pode ser classificada na categoria de risco definida por 2.000mg/kg $<$DL50 $<$5.000mg/kg (Categoria 5 no GHS) nos seguintes casos:

- Se direcionadas a essa categoria, por meio de um esquema de testes do anexo 2a-2d, baseado em incidência de morte.
- Se evidência confiável já estiver disponível, indicando que o DL50 está na faixa de valores da categoria 5; ou outro estudo de efeitos tóxicos em animais ou humanos indicarem preocupação com saúde humana de natureza aguda.
- Por extrapolação, estimativa ou tomada/obtenção dados, se uma atribuição a outra categoria de risco mais alta não se justificar, e:
- Informação confiável estiver disponível, indicando efeitos tóxicos significativos em humanos ou
- Alguma mortalidade for observada quando testada com valores de categoria 4 por via oral ou
- Quando julgamento de peritos confirmarem sinais clínicos e significativos de toxicidade quando testados sob valores de categoria 4, exceto diarreia, pilo-ereção ou uma aparência ruim ou
- Quando o julgamento de um especialista confirmar informações confiáveis indicando o potencial para um efeito agudo significante por outro estudo com animais.

TESTANDO DOSES ACIMA DE 2.000mg/kg

2. Reconhecendo a necessidade de proteger o bem-estar animal, testar a dosagem de 5.000mg/kg é desencorajado e deve ser considerado apenas se houver forte probabilidade de os resultados mostrarem relevância direta para proteger

saúde a humana e a animal[10]. Outros testes com níveis de dosagem maiores não devem ser conduzidos.

3. Quando é necessário testar doses de 5.000mg/kg, apenas um passo (ou seja, três animais) é requerido. Se o primeiro animal testado morrer, então a dosagem procede para 2.000mg/kg, em conformidade com o fluxograma do anexo 2. Se o primeiro animal sobreviver, mais dois animais são testados. Se apenas um dos três animais morrerem, espera-se que o valor DL50 exceda 5.000mg/kg. Se os dois animais morrerem, então a dosagem prossegue para 2.000mg/kg.

Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 425

Toxicidade oral aguda – protocolo "up-and-down"

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes OECD para o teste de substâncias químicas são periodicamente revisadas, à luz do progresso científico ou por mudança de práticas de avaliação. O conceito de teste de abordagem "up-and-down" foi primeiramente descrito por Dixon e Mood[1-4]. Em 1985, Bruce propôs o uso do procedimento "up-and--down" (UDP) para a determinação de toxicidade aguda em substâncias químicas[5]. Existem diversas variações do desenho experimental up-and-down para a estimativa de uma DL50. Esse protocolo é baseado no procedimento de Bruce, adotado pela ASTM (*American Society for Testing and Materials* ou Sociedade Americana para Testes e Materiais), em 1987[6], e revisado em 1990. Um estudo foi publicado, em 1995, comparando os resultados obtidos com o UDP, o teste DL50 convencional e o Procedimento de Dose Fixa (FDP- Fixed Dose Procedure – OECD Diretriz de Teste 420)[7]. Desde os primeiros documentos publicados por Dixon e Mood, estudos continuaram a ser feitos, examinando as melhores condições para uso desta abordagem[8-11]. Baseando-se nas recomendações de vários encontros de especialistas, em 1999, uma revisão adicional foi considerada necessária, porque: i) um acordo internacional definiu a mudança dos valores de corte de DL50 para a classificação de substâncias químicas; ii) o teste em somente um sexo (geralmente em fêmeas) agora é considerado suficiente; e iii) para que uma estimativa pontual seja significativa, é necessário estimar os Intervalos de Confiança (IC).

2. O procedimento de teste, descrito neste protocolo, é útil para minimizar o número de animais necessários para estimar a toxicidade oral aguda de uma substância química. Além da estimação da DL50 e dos Intervalos de Confiança, o teste permite a observação de sinais de toxicidade. Foi feita uma revisão da Diretriz de Teste 425 simultaneamente às revisões das Diretrizes 420 e 423.

3. Orientações para a seleção do método de teste mais apropriado para um dado propósito podem ser encontradas no Documento de Orientações para Teste de Toxicidade Oral[12]. Esse documento de orientação também contém

informação adicional na conduta e na interpretação da Diretriz 425.

4. Definições usadas no contexto desse protocolo estão no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. O laboratório deve considerar toda informação disponível da substância de teste antes de conduzir o estudo. Tal informação inclui a identidade e a estrutura química da substância de teste, suas propriedades físico-químicas, os resultados de qualquer outro teste de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância, os dados toxicológicos de substâncias estruturalmente relacionadas ou misturas similares e seu uso antecipado. Essas informações são úteis para determinar a relevância dos testes, para a proteção da saúde humana e do meio ambiente, e se vai ser útil na seleção da dose inicial apropriada.

6. O método permite estimativa de uma DL50 com intervalo de confiança e o resultado permite que a substância seja ranqueada e classificada de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS ou *Global Harmonized System*) para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda[16].

7. Quando não houver informação disponível para fazer uma estimativa preliminar da DL50 e da inclinação da curva dose-resposta, os resultados de simulações de computador têm sugerido que começar perto de 175mg/kg e usar meio-log para diluição (mais conhecido em inglês por *"half-log dilution"*, correspondendo à progressão de dose de fator 3,2) entre doses são medidas que produzirão os melhores resultados. Essa dose inicial deve ser modificada se a substância tiver grandes chances de ser altamente tóxica. O espaçamento de meio-log proporciona o uso mais eficiente dos animais e aumenta a precisão na predição do valor de DL50. Já que o método tem tendência à dose inicial, é essencial que essa dosagem ocorra abaixo da DL50 estimada (ver parágrafo 32 e anexo 2, para discussões sobre dose sequenciada e valores iniciais). Porém, para substâncias químicas com alta variabilidade (ou seja, leves inclinações na curvatura dose-resposta), vieses ainda podem ser introduzidos na estimativa de letalidade e a DL50 terá grande erro estatístico, similar a outros métodos de toxicidade aguda. Para corrigir isso, o teste principal inclui uma regra de pausa para decisão (*stopping rule*), baseada nas propriedades de estimativa, ao invés de um número fixo de testes de observação (ver parágrafo 33).

8. O método é o mais fácil de se aplicar a materiais que causam morte em um ou dois dias. O método não é prático de usar quando se esperam mortes tardias (5 dias ou mais).

9. Os computadores facilitam os cálculos individuais por animal, estabelecendo sequências de teste e fornecendo estimativas finais.

10. Substâncias de teste, em doses conhecidas por causar grande dor e angústia, devido à corrosão ou irritações severas, não precisam ser administradas. Animais moribundos, com dor evidente ou mostrando sinais de severo sofrimento devem ser eutanasiados e considerados na interpretação dos resultados dos testes, do mesmo modo que os mortos durante o teste. Critérios para tomar essa decisão de matar animais moribundos ou em sofrimento severo e orientação no reconhecimento de mortes previsíveis e iminentes são o assunto de um Documento de Orientação OECD[13].

11. Um teste limite pode ser usado eficientemente para identificar substâncias químicas que têm boas chances de ter toxicidade baixa.

PRINCÍPIOS DE TESTE LIMITE

12. O teste limite é um teste sequencial que usa, no máximo, cinco animais. Uma dose teste de 2.000 ou, excepcionalmente, de 5.000mg/kg pode ser usada. Os procedimentos para testar 2.000 e 5.000mg/kg são ligeiramente diferentes (ver parágrafos 23-25, para teste limite a 2.000mg/kg, e parágrafos 26-30, para teste limite a 5.000mg/kg). A seleção de um plano de teste sequencial aumenta o poder estatístico e intencionalmente enviesa o procedimento para rejeitar o limite do teste para compostos com DL50 perto da dose-limite; ou seja, errar a favor da segurança. Assim, como qualquer outro protocolo de teste limite, a probabilidade de classificar corretamente um composto vai diminuir à proporção que a DL50 real se assemelhar à dose-limite.

PRINCÍPIOS DO TESTE PRINCIPAL

13. O teste principal consiste em uma única progressão de dose ordenada na qual os animais são dosados, um de cada vez, em intervalo mínimo de 48 ho-

ras. O primeiro animal recebe uma dose abaixo do nível mais alto e estimado da DL50. Se o animal sobreviver, a dose para o próximo animal é aumentada em [um fator de] 3,2 vezes a dose original; se morrer, a dose para o próximo animal é diminuída em uma progressão de dose similar. Cada animal deve ser observado cuidadosamente por até 48 horas antes de se decidir se deve dosar o próximo animal e em qual dosagem.

[1] O fator 3,2 é um fator padrão, correspondendo à progressão de dose de uma unidade de meio-log. O parágrafo 32 tem mais orientações para a escolha do fator de espaçamento da dose.

Essa decisão é baseada em um padrão de sobrevivência de 48 horas de todos os animais até aquele momento (ver parágrafos 31 e 35 sobre escolha do intervalo de dose). Uma combinação de critérios para decisão de parada é usada para manter o número de animais baixo, enquanto se ajusta o padrão de dosagem, para reduzir o efeito de um valor inicial muito pequeno ou uma inclinação baixa (ver parágrafo 34). A dosagem é interrompida quando um desses critérios é atendido (ver parágrafos 33 e 41), momento no qual uma estimativa da DL50 e um intervalo de confiança são calculados para o teste, baseando-se no estado de todos os animais no término da fase. Para a maioria das aplicações, o teste estará completo com apenas quatro animais, depois de uma reversão inicial do resultado dos animais. A DL50 é calculada usando um método de máxima probabilidade[14,15] (ver parágrafos 41 e 43).

14. Os resultados do procedimento do teste principal servem como um ponto de partida para um procedimento computacional, a fim de prover um intervalo de confiança estimado, quando possível. Uma descrição da base deste IC está no parágrafo 45.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção da espécie animal

15. A espécie roedora preferida é o camundongo, embora outras espécies de roedores possam ser usadas. Normalmente, fêmeas são usadas[7]. Isso porque pesquisas bibliográficas de testes convencionais de DL50 mostram que, geralmente, há pequena diferença na sensibilidade entre os sexos; a não ser em nos casos nos quais diferenças são observadas, fêmeas são ligeiramente mais

sensíveis[10]. Apesar disso, se as propriedades toxicológicas ou toxicocinéticas conhecidas de químicos estruturalmente relacionados indicarem que machos são mais sensíveis, então este sexo deve ser usado. Quando o teste é conduzido em machos, justificativas adequadas devem ser fornecidas.

16. Animais adultos jovens e saudáveis, de espécie comuns de laboratório devem ser utilizados. Fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. Cada animal, no início de sua dose, deve ter entre 8 e 12 semanas de idade e seu peso deve cair num intervalo entre ±20% do peso inicial médio de animais previamente dosados.

Condições de acomodação e alimentação

17. A temperatura da sala experimental do animal deve estar em 22°C (±3°C). Embora a umidade relativa ideal seja entre 50% e 60%, deve-se observar o mínimo de 30% e preferencialmente não exceder 70%, a não ser que se esteja limpando o local. A luz deve ser artificial, usando a sequência de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os animais devem ser acomodados individualmente. Para alimentação, dietas de laboratório convencionais podem ser usadas, com abastecimento ilimitado de água.

Preparação de animais

18. Os animais são randomicamente selecionados, marcados com métodos indolores, para permitir identificação individual, e mantidos em suas caixas por, no mínimo, 5 dias antes de começar a dosagem, permitindo aclimatação às condições do laboratório. Como o desenho de outros testes sequenciais, deve se tomar cuidado para garantir que os animais tenham o tamanho e a idade (na faixa permitida) apropriados no estudo inteiro.

Preparação das doses

19. Em geral, as substâncias de testes devem ser administradas em volume constante, ao longo do intervalo de doses a serem testadas, variando a concentração da preparação da dose. Porém, quando uma substância final líquida ou uma mistura for testada, o uso de uma substância de teste não diluída – ou seja, uma concentração constante – pode ser mais relevante para uma avaliação de risco subsequente daquela substância, além de ser uma exigência de algumas autoridades regulatórias. Em qualquer um dos casos, o volume de dose máximo para administração não deve ser excedido. O volume máximo do líquido que pode ser administrado de uma vez depende do tamanho do animal de teste. Em roedores, o volume normalmente não deve exceder 1ml/100g do

peso corporal: porém, no caso de soluções aquosas, 2ml/100g do peso corporal podem ser considerados. Com respeito à formulação da preparação da dose, o uso de uma suspensão/emulsão/solução aquosa é recomendado quando possível, seguido, em ordem de preferência, por uma solução/suspensão/emulsão em óleo (como óleo de milho) e, por fim, uma solução em outros veículos. Para veículos diferentes de água, as características toxicológicas do veículo devem ser conhecidas.

As doses devem ser preparadas pouco antes da administração, a não ser que se demonstre e seja aceitável sua estabilidade de preparação durante o período em que vá ser utilizada.

PROCEDIMENTO

Administração de doses

20. A substância de teste é administrada em uma única dose por sonda gástrica, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. Na circunstância incomum de uma única dose não ser possível, a dose pode ser dada em frações menores, por período que não exceda 24 horas.

21. Animais devem estar em jejum antes da dosagem (ou seja, com o rato, comida, mas não água, deve ser retida durante a noite; com o camundongo, comida, mas não água, deve ser retida por 3-4 horas). Seguindo o período de jejum, os animais devem ser pesados e a substância teste administrada. O peso corporal em jejum de cada animal é determinado e a dose é calculada de acordo com o peso. Após a substância ser administrada, comida deve ser retirada por mais 3-4 horas para ratos e 1-2 horas para camundongos. Quando a dose é administrada em frações por um período de tempo, pode ser necessário prover os animais com comida e água, dependendo da duração desse período.

Teste limite e teste principal

22. O teste limite é principalmente usado em situações nas quais o experimentador tem informações que indicam que a substância de teste é provavelmente não tóxica, ou seja, tem toxicidade abaixo do limite de doses regulatórias. Informação sobre a toxicidade da substância de teste pode ser obtida em anotações sobre compostos, misturas ou produtos similares já testados, levando-se em consideração a identidade e a porcentagem de componentes conhecidos

por terem significância toxicológica. Nas situações nas quais se tem pouca ou nenhuma informação sobre sua toxicidade, ou nas quais o material de teste é previsto ser tóxico, o teste principal deve ser efetuado.

Teste limite

Teste limite a 2.000mg/kg

23. Trata-se um animal com a dose teste. Se o animal morrer, conduzir o estudo principal para determinar a DL50. Se o animal sobreviver, dosar quatro animais adicionais, sequencialmente, para que o total de cinco animais seja testado. Porém, se três animais morrerem, o teste limite é terminado e o teste principal é feito. A DL50 será maior do que 2.000mg/kg se três ou mais animais sobreviverem. Se um animal, inesperadamente, morrer tardiamente em um estudo e ainda há outros sobreviventes, é apropriado parar a dosagem e observar todos animais, para verificar se outros animais vão morrer também, durante período de observação semelhante (ver parágrafo 31 para período de observação inicial). Mortes tardias devem ser contadas da mesma forma que outras mortes. Os resultados são avaliados como segue (O=sobreviveu, X=morte).

24. A DL50 é menor que a dose de teste (2.000mg/kg) quando três ou mais animais morrerem.

O XO XX

O OX XX

O XX OX

O XX X

Se um terceiro animal morrer, conduzir o estudo principal.

25. Teste cinco animais. A DL50 será maior que a teste dose (2.000mg/kg) quando três ou mais animais sobrevivem.

O OO OO

O OO XO

O OO OX

O OO XX

O XO XO

O XO OO/X

O OX XO

O OX OO/X

O XX OO

Teste limite a 5.000mg/kg

26. Excepcionalmente, e apenas quando for justificado por necessidades regulatórias específicas, o uso de uma dose de 5.000mg/kg pode ser considerado (veja anexo 4). Por razões de bem-estar animal, testes em animais em Categoria 5 no sistema GHS (2.000-5.000mg/kg) é desencorajado e deve ser considerado apenas quando há grande chance de tal teste ter relevância direta na proteção da saúde humana ou animal ou do meio ambiente.

27. Dosa-se um animal na dose teste. Se o animal morrer, conduzir um estudo principal para determinar a DL50. Se o animal morrer, dosar mais dois animais. Se os dois sobreviverem, a DL50 será maior do que a dose limite e o teste está terminado (ou seja, realizada uma observação completa de 14 dias sem a dosagem de mais animais).

28. Se um ou mais animais morrerem, então se dosam mais dois animais, um de cada vez. Se, de forma inesperada, um animal morrer tardiamente no estudo, e há outros sobreviventes, é apropriado parar a dosagem e observar os animais, para ver se algum outro morrerá durante período de observação similar (ver parágrafo 10 para período de observação inicial). Mortes tardias devem ser contadas como as outras mortes. Os resultados são avaliados como segue (O=sobreviver, X=morreu, e U=desnecessário).

29. A DL50 é menor que a dose teste (5.000mg/kg) quando três ou mais animais morrerem.

O XO XX

O OX XX

O XX OX

O XX X

30. A DL50 é maior que a dose teste (5.000mg/kg) quando três ou mais animais sobrevivem.

O OO

O XO XO

O XO O

O OX XO

O OX O

O XX OO

Teste principal

31. Os animais são dosados em sequência, com 48 horas de intervalo. Entretanto, o intervalo de tempo entre a dosagem é determinado pelo início, pela duração e pela severidade dos sinais tóxicos. O tratamento de um animal para a próxima dose deve ser retardado até que se tenha certeza da sobrevivência dos outros animais previamente dosados. O intervalo deve ser ajustado apropriadamente; por exemplo, em caso de resposta inconclusiva. É mais simples se implementar o teste quando um único intervalo de tempo é usado nas tomadas de decisão de dosagens sequenciais. Mesmo assim, não é necessário recalcular a dosagem ou as razões de probabilidade se o intervalo de tempo mudar no meio do teste. Para a seleção da dose inicial, toda informação disponível, incluindo dados sobre substâncias estruturalmente relacionadas e resultados de qualquer outro estudo de toxicidade no material de teste, deve ser usada, para a aproximação da DL50 e também da inclinação da curva dose-resposta.

32. O primeiro animal é dosado no nível abaixo da melhor estimativa preliminar da DL50. Se o animal sobreviver, o segundo animal recebe uma dose maior. Se o primeiro animal morrer ou aparentar estar moribundo, o segundo animal recebe uma dose menor. O fator de progressão da dose deve ser escolhido para ser o antilog de 1/(o valor estimado da inclinação da curva dose-resposta) e deve permanecer constante pela duração do teste (uma progressão de 3,2 corresponde

a uma inclinação de 2). Quando não há informação sobre a inclinação da substância a ser testada, se usa um fator de progressão da dose de 3,2. Usando o fator de progressão padrão, as doses seriam selecionadas da sequência: 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 2.000 (ou 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1.750; 5.000, para as necessidades regulatórias específicas). Se não há estimativa disponível da letalidade da substância, a dosagem deve ser iniciada a 175mg/kg. Na maioria dos casos, essa dose é subletal e serve para reduzir o nível de dor e sofrimento. Se a tolerância esperada do animal pela substância química for altamente variada (ou seja, uma inclinação que espera ser menor do que 2,0), deve-se considerar o aumento do fator de progressão da dose, além do padrão de 0,5 na escala log de dose (ou seja, fator de progressão 3,2) antes de começar o teste. Similarmente, para substâncias de teste conhecidas por terem inclinação acentuada, deve-se escolher o fator de progressão da dose menor do que o padrão (anexo 2 inclui uma tabela da progressão da dose para números de inclinação inteiros, variando de 1 a 8, para dose inicial de 175mg/kg).

33. A dosagem continua dependendo do resultado do intervalo fixo de tempo (como 48 horas) de todos os animais até aquele momento. O teste é terminado quando um dos seguintes critérios de parada forem obedecidos:

(a) 3 animais consecutivos sobreviverem ao maior limite;

(b) 5 reversões ocorrerem em 6 animais consecutivos testados;

(c) Ao menos 4 animais seguiram a primeira reversão e as taxas de probabilidade especificadas excederam o valor crítico. (Veja o parágrafo 44 no anexo 3. Cálculos são feitos a cada dosagem, seguindo o quarto animal depois da primeira reversão).

Para ampla variedade de combinações de DL50 e de inclinações, a regra de parada de decisão (c) será satisfeita com 4 ou 6 animais, depois da reversão do teste. Em alguns casos, para substâncias químicas com inclinação leve nas curvas de dose-resposta, animais adicionais (até o total de quinze testados) podem ser necessários.

34. Quando o critério de parada for alcançado, a DL50 estimada deve ser calculada do resultado do animal no término do teste, usando o método descrito nos parágrafos 40 e 41.

35. Animais moribundos/eutanasiados são considerados da mesma maneira que animais que morreram durante o teste. Se um animal, de forma inesperada, morrer tardiamente no estudo e ainda houver outros sobreviventes àquela dose ou maior, é apropriado parar a dosagem e observar todos os animais, para ver se outros morrerão durante período de observação similar. Se sobreviventes subsequentes também morrerem, e parecer que todos níveis de dosagem excedem a DL50, seria mais apropriado reiniciar o estudo, começando por, no mínimo, dois níveis abaixo da menor dose que causou morte (e aumentar o período de observação), visto que a técnica é mais precisa quando a dose inicial é menor do que a DL50. Se os demais animais sobreviverem a doses iguais ou maiores à que matou o animal, não é necessário mudar a progressão de dose, já que a informação do animal que morreu será incluída nos cálculos como uma morte a uma dose menor do que a dos sobreviventes, reduzindo-se o valor da DL50.

OBSERVAÇÕES

36. Animais são observados, individualmente, depois de dosados, no mínimo, uma vez durante os primeiros 30 minutos; periodicamente, durante as primeiras 24 horas, com atenção especial durante as primeiras quatro horas, e, diariamente, depois disso, pelo total de 14 dias, exceto se eles precisarem ser removidos do estudo e eutanasiados por questões de bem-estar animal ou se forem encontrados mortos. Porém, a duração da observação não deve ser rigidamente fixa. Ela deve ser determinada por reações tóxicas, tempo de aparecimento e duração de períodos de recuperação e pode assim ser estendido quando considerado necessário. Os períodos em que sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, especialmente se houver tendência de sinais tóxicos tardios[17]. Todas as observações são sistematicamente anotadas, com registros individuais sendo mantidos para cada animal.

37. Observações adicionais serão necessárias se os animais continuarem a mostrar sinais de toxicidade. Estas observações devem incluir: mudanças na pele e no pelo, olhos e membranas mucosas, alterações respiratórias, circulatórias, no sistema nervoso central e autônomo e atividade somatomotora e de comportamento. Atenção deve ser dada a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Os princípios e os critérios sumarizados no Documento de Orientação de Desfechos Humanos[13] devem ser considerados. Animais encontrados moribundos e animais mostran-

do dor severa ou sinais de angústia severa devem ser eutanasiados. Quando animais são eutanasiados ou encontrados mortos, o horário de morte deve ser registrado o mais preciso possível.

Peso corporal

38. O peso individual dos animais deve ser determinado pouco antes da substância de teste ser administrada e, no mínimo, semanalmente depois disso. Mudanças de peso devem ser calculadas e registradas. No fim do teste, os animais que sobreviverem serão pesados e depois eutanasiados.

Patologia

39. Todos os animais de testes (incluindo aqueles que morreram durante o teste ou foram removidos do estudo por bem-estar animal) devem ser sujeitos à ampla autópsia. Todas as grandes mudanças patológicas devem ser registradas para cada animal. Exame microscópico de órgãos, mostrando evidências de patologia importante, em animais sobreviventes por 24 horas ou mais depois da dose inicial, deve ser considerado, pois talvez produza informação útil.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

40. Dados individuais de cada animal devem ser providos. Adicionalmente, todos os dados devem ser sumarizados em forma de tabelas, mostrando, para cada grupo de animais de teste usados, o número de animais com sinais de toxicidade[17], o número de animais encontrados mortos durante o teste ou mortos por razões humanas, o horário da morte de cada animal, uma descrição e o tempo de efeitos tóxicos e reversibilidade e os resultados da autópsia.

Cálculos da DL50 para o Teste Principal

41. A DL50 é calculada usando um método de probabilidade máxima[14,15], exceto no caso descrito no parágrafo 42. Os detalhes estatísticos seguintes podem ajudar na implementação dos cálculos de probabilidade máxima sugeridos (com um σ assumido). Todas as mortes, imediatas ou tardias, ou as eutanásias são incorporadas, para o propósito da análise de probabilidade máxima. Segundo Dixon[4], a função de probabilidade é escrita assim:

$L = L1\ L2\ ...Ln$

Onde,

L é a probabilidade do resultado experimental, dado μ e σ, e n é número total de animais testados.

Li = 1 – F(Zi) se o i animal sobreviver, ou

Li = F(Zi) se o i animal morrer

Onde:

F = distribuição normal padrão acumulada.

$Zi = [\log(d_i) - \mu] / \sigma$

di= dose dada ao i animal, e

σ = desvio padrão em unidades log da dose (que não é o desvio log padrão).

Uma estimativa da DL50 original é dada pelo valor de μ que maximiza a probabilidade L (veja parágrafo 43).

Uma estimativa de σ de 0,5 é usada a não ser que um valor genérico melhor ou específico do caso esteja disponível.

42. Sob algumas circunstâncias, o cálculo estatístico não será possível ou provavelmente dará resultados errôneos. Meios especiais para determinar/ reportar uma DL50 estimada estão disponíveis para essas circunstâncias:

(a)Se o teste parou devido ao critério (a) no parágrafo 33 (ou seja, uma dose limite foi testada repetidamente), ou se o limite máximo da dose acabou sendo testado, e a DL50 foi reportada acima do limite máximo. A classificação é completada nessa base;

(b) Se todos os animais mortos tiverem doses maiores que todos animais vivos (ou se todos animais vivos tiverem doses maiores do que as dos animais mortos, o que é praticamente improvável), então a DL50 está entre as doses dos animais vivos e mortos. Essas observações não dão informação adicional do exato valor da DL50. Ainda assim, uma estimativa da probabilidade máxima da DL50 pode ser feita, desde que haja um valor para σ. Critério de parada (b) no parágrafo 33 descreve uma dessas circunstâncias;

(c) Se os animais vivos e mortos tiverem apenas uma dose em comum e todos os outros animais tiverem uma dose maior e todos animais vivos uma dose menor, ou vice-versa, então a DL50 é igual à dose comum. Se uma substância aproximada relacionada é testada, o teste deve proceder com uma menor progressão de dose.

Se nenhuma das situações acima ocorrer, então a DL50 é calculada usando o método de probabilidade máxima.

43. Cálculos de probabilidade máxima podem ser feitos usando-se pacotes de programas de computador, como SAS[14] (como exemplo, PROC NLIN) ou BMDP[15] (como exemplo, programa AR), descrito no Apêndice 1D na referência 3. Outros programas de computador podem ser usados também. Instruções típicas para esses pacotes são dadas no apêndice, para o padrão E 1163-87 ASTM[6]. [O σ usado no programa BASIC na referência bibliográfica/literatura 6 precisará ser editado para refletir os parâmetros deste protocolo de teste OECD 425]. O resultado do programa é uma estimativa do log (DL50) e seu erro padrão.

44. A regra de parada da razão de probabilidade (c) no parágrafo 33 é baseada em três medidas de progresso do teste, que são da forma da probabilidade no parágrafo 41 com valores diferentes para μ. Depois que cada animal é testado, se fazem comparações a partir do sexto que já não satisfaça o critério (a) ou (b) do parágrafo 33. As equações para os critérios da taxa da probabilidade são dadas no anexo 3. Se o critério for satisfeito, o teste é parado e o DL50 é calculado pelo método de probabilidade máxima.

Cálculo de Intervalo de Confiança

45. Seguindo o teste principal e o cálculo de DL50 estimada, talvez seja possível calcular por computador os intervalos de estimativas para a DL50. Qualquer um desses intervalos de confiança fornecem informações valiosas sobre a confiabilidade e utilidade do teste principal que foi conduzido. Um longo intervalo de confiança indica que se tem mais incerteza associada à DL50 estimada. Se a confiabilidade da DL50 estimada for baixa, a utilidade dessa estimativa não é tão grande. Um intervalo estreito indica que há uma incerteza relativamente baixa associada ao valor estimado de DL50. Se a confiabilidade da DL50 estimada for alta, sua utilidade é boa. Isso significa que se o teste principal for repetido, a nova estimativa de DL50 deverá ser próxima à estimativa original da DL50 e ambas deveriam ser próximas ao valor verdadeiro da DL50.

46. Dependendo do resultado do teste principal, se calcula um de dois diferentes tipos de intervalos de estimativas da verdadeira DL50.

- Quando, ao menos, três doses diferentes forem testadas e a dose do meio tiver, ao menos, um animal que sobreviveu e um que morreu, se usa um procedimento computacional da probabilidade baseada no perfil para obter um intervalo de confiança, o qual se espera conter a DL50 real em 95% das vezes. Entretanto, por conta do pequeno número de animais que se espera usar, o nível real de confiança geralmente não é exato[18]. A regra de parada aleatória aumenta a habilidade de o teste responder às condições variáveis de base, mas também faz diferirem um pouco os níveis reportado e o de confiança[19].
- Se todos os animais sobreviverem a uma dose igual ou menor do que a uma dada dose e todos animais morrerem quando dosados a um nível de dose maior, um intervalo é calculado, tendo como seu menor limite a maior dose testada onde todos os animais sobreviveram e no seu limite superior, o nível de dose onde todos os animais morreram. Esse intervalo é rotulado como "aproximado". O nível de confiança exato associado com esse intervalo não pode ser especificamente determinado. Porém, como esse tipo de resposta apenas acontece quando a resposta da dose é uma curva acentuada, na maioria dos casos, a verdadeira DL50 deverá ser encontrada dentro do intervalo calculado ou muito próximo a ele. Esse intervalo vai ser relativamente pequeno e suficientemente preciso para a maioria dos usos práticos.

47. Em algumas instâncias, intervalos de confiança são reportados como infinitos, incluindo tanto o 0 (zero) como seu limite mínimo ou infinito com seu limite máximo, ou os dois. Tais intervalos, por exemplo, podem ocorrer quando todos os animais morrerem ou todos sobreviverem. Implementar esses procedimentos requer cálculo especializado, usando ou um programa dedicado disponível pela USEPA ou OECD ou desenvolvido seguindo detalhes técnicos disponíveis pela USEPA ou OECD[20]. A cobertura atingida desses intervalos e as propriedades do programa dedicado são descritas nos relatórios[21] também disponíveis por meio da USEPA.

Relatório do teste

48. O relatório de teste deve incluir as seguintes informações, conforme apropriado:

- Substância de teste:
  - Dados de identificação, incluindo número CAS.
- Veículos (se apropriado):
  - Justificativa para o uso de veículos que não sejam a água.
- Animais de teste:
- Condições do teste:
  - Razão para a seleção da dose inicial, fator de progressão e de sequência dos níveis de dose;
  - Detalhes da formulação da substância de teste, incluindo detalhes do estado físico do material administrado;
  - Detalhes da administração da substância de teste, incluindo o volume e o tempo da dosagem;
  - Detalhes da qualidade da comida e água (incluindo tipo/ fonte de dieta, fonte de água).
- Resultados:
  - Peso corporal/ mudanças de peso;
  - Tabulação dos dados de resposta e nível de dose de cada animal (ou seja, animais mostrando sinais de toxicidade incluindo natureza, severidade e duração de efeitos e mortalidade);
  - Peso individual de cada animal no dia da dosagem, em intervalos semanais depois disso e no horário de morte ou sacrifício;

- Período de tempo do aparecimento de sinais de toxicidade e se esses foram reversíveis para cada animal;
- Achados da autópsia e qualquer detalhe histopatológico para cada animal, se possível;
- Dados sobre a DL50;
- Tratamento estatístico dos resultados (descrição de rotina de computador usada e tabelas de cálculos).

• Discussão e interpretação de resultados.

• Conclusão.

LITERATURA

(1) Dixon W.J. and A.M. Mood. (1948). A Method for Obtaining and Analyzing Sensitivity Data. J. Amer. Statist. Assoc., 43, 109-126.

(2) Dixon W.J. The Up-and-Down Method for Small Samples (1965). J. Amer. Statist. Assoc. 60, 967-978.

(3) Dixon W.J. (1991). Staircase Bioassay: The Up-and-Down Method. Neurosci. Biobehav. Rev., 15, 47-50.

(4) Dixon W.J. (1991) Design and Analysis of Quantal Dose-Response Experiments (with Emphasis on Staircase Designs). DixonStatistical Associates, Los Angeles CA, USA.

(5) Bruce R.D. (1985). An Up-and-Down Procedure for Acute Toxicity Testing. Fundam. Appl. Tox., 5, 151-157.

(6) ASTM (1987). E 1163-87, Standard Test Method for Estimating Acute Oral Toxicity in Rats. American Society for Testing and Materials, Philadelphia Pa, USA.

(7) Lipnick R.L., Cotruvo J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I., Goddard M., Segal L., Springer J.A., and Myers R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional DL50 and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol., 33, 223-231.

(8) Choi S.C. (1990). Interval estimation of the DL50 based on an up-and-down experiment. Biometrics 46, 485-492.

(9) Vågerö M. and R. Sundberg. (1999). The distribution of the maximum likelihood estimator in upand-down experiments for quantal dose-response data. J. Biopharmaceut. Statist. 9(3), 499-519.

(10) Hsi B.P. (1969). The multiple sample up-and-down method in bioassay. J. Amer. Statist. Assoc. 64, 147-162.

(11) Noordwijk van A.J. and van Noordwijk J. (1988). An accurate method for estimating an approximate lethal dose with few animals, tested with a Monte Carlo procedure. Arch. Toxicol. 61, 333-343.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(14) SAS Institute Inc. (1990). SAS/STAT® User’s Guide. Version 6, Fourth Ed. or later. Cary, NC, USA.

(15) BMDP Statistics Software, Inc. (1990). BMDP Statistical Software Manual. W.J. Dixon, Chief Ed. 1990 rev. or later. University of California Press, Berkeley, CA, USA.

(16) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmentl a Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, pg 11. [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24no-0,FF.html].

(17) Chan P.K. and Hayes A.W. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

(18) Rosenberger W.F., Flournoy N. and Durham S.D. (1997). Asymptotic normality of maximum likelihood estimators from multiparameter response-driven designs. Journal of Statistical Planning and Inference 60, 69-76.

(19) Jennison C. and Turnbull B.W. 2000. Group Sequential Methods with Application to Clinical Trials. Chapman & Hall/CRC: Boca Raton, FL. USA.

(20) Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Programme (AOT 425 StatPgm). Version: 1.0, 2001. [http://www.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-document524-nodirectorate-no-24-6775-8,FF.html]

(21) Westat. 2001. Simulation Results from the AOT425StatPgm Program. Report prepared for U.S. E.P.A. under Contract 68-W7-0025, Task Order 5-03.

ANEXO 1

Definições

Toxicidade Oral Aguda: se refere àquelas ocorrências de efeitos adversos que seguem a administração oral de uma única dose da substância, ou múltiplas doses dadas no intervalo de 24 horas.

Morte tardia: significa que um animal não morreu, nem aparenta estar moribundo em 48 horas, mas morreu depois do período de observação de 14 dias.

Dose: é a quantidade de substância de teste administrada. Dose é expressa com o peso da substância de teste sobre o peso do animal (por exemplo, mg/kg).

Fator de progressão de dose, também chamado *de Fator de espaçamento de dose:* refere-se ao múltiplo pelo qual a dose será aumenta (ou seja, a progressão da dose), quando um animal sobrevive, ou o divisor que diminui, quando o animal morre. O fator de progressão da dose recomendado é o antilog de 1/(o valor da inclinação estimada da curva dose-resposta). O fator de progressão de dose padrão é 3,2 = antilog 0,5 = antilog ½.

GHS: Sistema Harmonizado de Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Uma atividade em conjunto da OECD (Saúde Humana e Meio-ambiente), Comitê de Peritos da ONU sobre Transporte e Mercadorias Perigosas (propriedades físico-químicas) e ILO (Comunicação de riscos) e Coordenado pelo Programa de Interorganização para o Gerenciamento de Som de Substâncias químicas (IOMC).

Morte iminente: quando o estado moribundo ou morte é esperado antes do próximo período planejado de observação. Sinais que indicam esse estado em roedores podem incluir convulsões, posição lateral, ficar inclinado e tremor (veja o Documento de Orientação de Desfechos Humanos[13] para mais detalhes).

DL50 (dose oral letal média): de origem estatística, é uma dose única de uma substância que pode causar a morte de 50% dos animais, quando administrada via oral. O valor DL50 é expresso em termos de peso da substância sobre o peso do animal de teste (mg/kg).

Dose limite: refere à dose de um limite superior para testes (2.000 ou 5.000mg/kg).

Estado Moribundo: estar morrendo ou incapaz de sobreviver, mesmo se tratado (Veja o Documento de Orientação para Desfechos Humanos[8] para mais detalhes).

Tamanho de amostra nominal: refere-se ao número total de animais testados, menos um que apresenta resposta similar ao início da série ou o número total de animais testados, sem incluir o par que cria a primeira reversão. Por exemplo, para uma série onde X e O indicam resultados opostos (por exemplo, X poderia ser: "morreu em 48 horas" e O: "sobreviveu") em um padrão que segue: OOO-XXOXO, nós temos o número total de animais testados (ou tamanho da amostra em sentido convencional) como 8, e o tamanho da amostra nominal é 6. Esse exemplo particular mostra 4 animais seguindo uma reversão. É importante deixar claro se uma contagem em uma parte dessa diretriz se refere ao tamanho de amostra nominal ou ao total de números testados. O tamanho real máximo é 15. Quando teste é parado baseado no número máximo, o tamanho de amostra nominal será menor ou igual a 15. Membros da amostra nominal começam com o animal nº. (r-1) (o animal antes do segundo no par reverso) (veja reversão abaixo).

Morte previsível: é a presença de sinais clínicos, indicando a morte em um momento futuro conhecido antes do final planejado para o experimento, por exemplo: incapacidade de ingerir água ou comida. (Veja o Documento de Orientação para Desfechos Humanos[13] para mais detalhes).

Transformação Integral de Probabilidade: é as vezes encontrado em sua abreviação (em inglês para Probability Integral Transformation). Probit e um modelo de dose-resposta que permite uma distribuição-padrão normal das respostas esperadas (ou seja, uma centrada em sua média e dimensionada para o seu desvio padrão, σ) para as doses (tipicamente em uma escala logarítmica) serem analisadas como se fosse uma linha reta com inclinação recíproca de σ. Uma distribuição normal de letalidade padrão é simétrica; portanto, sua média é também sua DL50 verdadeira ou resposta mediana real.

Reversão: é a situação na qual a não-resposta é observada em alguma dose e uma resposta é observada na próxima dose testada, ou vice-versa (ou seja, resposta seguida de não-resposta). Portanto, uma reversão é criada por um par de respostas. O primeiro destes pares ocorre em animais numerados r-1 e r.

σ: é o desvio padrão de uma curva de log normal, descrevendo a faixa de tolerâncias dos sujeitos de teste à substância química (onde se espera que um sujeito seja capaz de responder se a dose exceder sua tolerância). O σ estimado oferece uma estimativa da variação dos animais em resposta a uma faixa completa de doses.

Ver "inclinação" e "Probit".

Inclinação (da curva dose-resposta): é o valor relacionado ao ângulo em que a curva dose-resposta sobe a partir do eixo da dose. No caso de análise "Probit", quando respostas são analisadas em uma escala "probit" contra uma dose em uma escala log, essa curva será uma linha reta e a inclinação será recíproca ao σ, o desvio padrão das tolerâncias da amostra de teste, para as quais se assume uma distribuição normal. Ver "probit" e σ.

Regra de parada: é usada nessa diretriz como sinônimo de 1) um critério específico de parada e 2) o conjunto de todos critérios, determinando quando um teste sequencial termina. Em particular, para o teste principal, a regra de parada é usada no parágrafo 7 como uma abreviação para o critério que depende na comparação de razões para um valor crítico.

ANEXO 2

Procedimento de dose

Dose sequencial para o teste principal

1. Procedimento de dosagem "Up-and-Down". Para cada rodada, os animais são tratados, um de cada vez, com intervalos de 48 horas. O primeiro animal recebe uma dose um nível abaixo da melhor estimativa da DL50. Esta seleção reflete um ajuste para uma tendência *de se desviar da DL50* na direção da dose inicial na estimativa final (veja parágrafo 7 dessa diretriz). Espera-se que o padrão dos resultados se estabilize, enquanto a dosagem é ajustada para cada animal subsequente. O Parágrafo 3 abaixo fornece mais orientações para escolha do fator de espaçamento de dose.

2. Progressão de dose padrão: Uma vez que a dose inicial e o fator de espaça-

mento de dose forem decididos, o toxicologista deve listar todas as doses possíveis, incluindo os limites acimas (geralmente 2.000 ou 5.000mg/kg). Doses próximas do limite máximo devem ser removidas da progressão. A natureza escalonada do desenho DT 425 prevê que as primeiras doses funcionem como uma sequência auto-ajustável. Por causa da tendência de vies positivo, no caso de nada ser conhecido sobre a substância, uma dose inicial de 175mg/kg é recomendada. Se o procedimento padrão for usado no teste principal, a dosagem iniciará em 175mg/kg e doses serão espaçadas com um fator de 0,5 em uma escala log da dose. As doses a serem usadas incluem 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 2.000 ou, para necessidades regulatórias específicas, 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1.750; 5.000. Para certas substâncias altamente tóxicas, a dosagem sequencial talvez precise ser estendida para valores mais baixos.

3. No caso de um fator de progressão de dose, diferente do padrão ser considerado adequado, a tabela 1 fornece progressões de dose para múltiplos de números inteiros de inclinação, de 1 a 8.

Tabela 1: Progressão de dose para diretriz de teste OECD 425

Escolha uma inclinação e leia a coluna

Todas as doses em mg/kg de peso corporal

Inclinação =	1	2	3	4	5	6	7	8
	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*
							24	23
					0,275	0,26		
				0,31			0,34	0,31
			0,375			0,375		
								0,41
					0,44		0,47	
		0,55		0,55		0,55		0,55
					0,69		0,65	
								0,73
			0,81			0,82		
				0,99			0,91	0,97

Inclinação =	1	2	3	4	5	6	7	8
					1,09	1,2		
							1,26	1,29
	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
							2,4	2,3
					2,75	2,6		
				3,1			3,4	3,1
			3,75			3,75		
					4,4			4,1
							4,7	
		5,5		5,5		5,5		5,5
					6,9		6,5	
								7,3
			8,1			8,2		
				9,9			9,1	9,7
					10,9	12		
							12,6	12,9
	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
							24	23
					27,5	26		
				31			34	31
			37,5			37,5		
					44			41
							47	
		55		55		55		55
							65	
					69			73
			81			82		
				99			91	97
					109	120		
							126	129
	175	175	175	175	175	175	175	175
							240	230
					275	260		
				310			340	310
			375			375		

Inclinação =	1	2	3	4	5	6	7	8
					440			410
							470	
		550		550		550		550
							650	
					690			730
			810			820		
				990			910	970
					1090	1200		
							1260	1290
	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750
							2400	2300
					2750	2600		
				3100				3100
						3750	3400	
								4100
	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

ANEXO 3

Cálculos para regra de parada por razão de probabilidade

1. Como descrito no parágrafo 33 da Diretriz, o teste principal pode ser completado assim que o primeiro de três critérios de parada ocorrer. Em qualquer caso, mesmo se nenhum dos critérios acontecer, a dosagem parará quando 15 animais forem tratados. Tabelas 2-5 ilustram exemplos nos quais testes começaram sem nenhuma informação, de modo que foram usados o valor de início padrão, 175mg/kg, e o fator de progressão de dose padrão recomendado (3,2 ou meio log). Importante observar que a formatação dessas tabelas é apenas ilustrativa.

2. A tabela 2 mostra como o teste principal pararia se três animais sobrevivessem à dose limite de 2.000mg/kg. A tabela 3 mostra uma situação similar, quando a dose limite de 5.000mg/kg é usada (essas ilustram situações em que um teste limite não foi considerado apropriado a *priori*). A tabela 4 mostra como uma sequência particular de 5 reversões em 6 animais testados poderia ocorrer e permitir a conclusão do teste. Por último, a tabela 5 ilustra uma situação, na qual nem o critério (a), nem

o critério (b) ocorrem; uma reversão de resposta ocorreu, seguida por 4 animais testados e, consequentemente, o critério (c) deve ser avaliado também.

3. O critério (c) exige que uma regra de parada por razão de probabilidade seja avaliada após o teste em cada animal, começando com o quarto animal após a reversão. Três "medidas do progresso de teste" são calculadas. Tecnicamente, essas medidas de progresso são probabilidades, como recomendado para a estimativa de probabilidade máxima da DL50. O procedimento está intimamente relacionado ao cálculo de um intervalo de confiança por um processo baseado em probabilidade.

4. A base do procedimento é que, quando dados suficientes forem coletados, uma estimativa pontual da DL50 deve ser mais fortemente apoiada, ao invés de valores acima e abaixo da estimativa pontual, onde o suporte estatístico é quantificado usando-se a probabilidade. Portanto, três valores de probabilidade são calculados: uma probabilidade a um ponto estimado de DL50 (chamado de estimativa aproximada ou estimativa da média da dose, no exemplo); uma probabilidade ao valor abaixo do ponto estimado; e a probabilidade no valor acima do ponto estimado. Especificamente, o valor abaixo é o ponto estimado dividido por 2,5 e o valor acima é o ponto estimado multiplicado por 2,5.

5. Os valores de probabilidade são comparados, calculando-se razões de probabilidade (RP, em inglês *likelihood ratio*) e determinando-se se essas excedem um valor crítico. O teste é interrompido quando a razão da probabilidade para o ponto estimado excede cada uma das outras probabilidades por um fator de 2,5, que indica suporte estatístico relativamente forte para o ponto estimado. Por conseguinte, duas razões de probabilidade são calculadas: uma razão de probabilidade para o ponto estimado e o ponto estimado dividido por 2,5; e uma razão para o ponto estimado e o ponto estimado vezes 2,5.

6. Os cálculos de DL50 em si são facilmente realizados em qualquer planilha com funções normais de probabilidade. Os cálculos são ilustrados na tabela 5, no anexo 3, que é estruturado para imitar a implementação de planilhas. Os passos de cálculo são ilustrados usando um exemplo no qual o limite superior da dose é 5.000mg/kg, mas os passos de cálculo são executados da mesma forma que quando o limite superior da dose é 2.000mg/kg. Alternativamente, os sites OECD e USEPA disponibilizam, para download, programas independentes, que fornecem grades/planilhas de entrada de dados dos animais e incorpora as fórmulas necessárias para a estimação da DL50 e o cálculo de intervalos de confiança. A tabela 6 mostra uma imagem de tela desse software (programa).

Exemplo hipotético usando uma dose de limite superior de 5.000mg/kg (tabela 5)

7. No exemplo hipotético, utilizando uma dose de limite superior de 5.000mg/kg, o critério de parada da razão de probabilidade foi encontrado, depois de nove animais serem testados. A primeira "reversão" ocorreu com o terceiro animal testado. O critério de parada da razão de probabilidade é checado quando quatro animais são testados depois da reversão. Nesse exemplo, um quarto animal testado depois da reversão é o sétimo animal realmente testado. Portanto, para esse exemplo, os cálculos da tabela são apenas necessários depois de o sétimo animal ser testado; os dados poderiam ter sido registrados naquele momento. Subsequentemente, o critério de parada da razão de probabilidade teria sido checado depois do teste no sétimo, no oitavo e no nono animais. O critério de parada da razão de probabilidade é satisfeito primeiro depois de o nono animal ser testado nesse exemplo.

A. Introduza a informação da dose-resposta animal por animal.

Coluna 1. Passos são numerados 1-15. Não mais de 15 animais devem ser testados.

Coluna 2. Posicione um I nessa coluna cada vez que um animal é testado.

Coluna 3. Introduza a dose recebida pelo (número do) animal.

Coluna 4. Indique se um animal respondeu (mostrado por um X) ou não (mostrado por um O).

B. O tamanho da amostra real e nominal.

8. A amostra nominal consiste nos dois animais que representam a primeira reversão (aqui o segundo e terceiro animal), somado a todos os demais animais testados depois disso. Aqui, Coluna 5 indica se um dado animal é incluído ou não na amostra nominal.

O tamanho de amostra nominal (nominal n) aparece na linha 16. Esse é o número de animais na amostra nominal. No exemplo, nominal n é 8.

O número real de testes aparece na linha 17.

C. Estimativa aproximada do DL50.

9. A média geométrica das doses para os animais na amostra nominal atual é

usada como uma estimativa aproximada da DL50 para medir o processo. Nessa tabela, isso é chamado de "estimador de dose média". Ele é atualizado com cada animal testado. Essa média é restrita à amostra nominal, a fim de permitir uma escolha inadequada da dose inicial do teste, o que poderia gerar uma sequência inicial de respostas ou uma sequência inicial de não respostas. Porém, os resultados para todos os animais são usados nos cálculos de probabilidade para o cálculo da DL50 final abaixo. Lembrar que a média geométrica de n números é o produto dos n números, elevado a 1/n.

A estimativa da média de dose aparece na linha 18 (exemplo $(175 * 550 * ... * 1750)^{1/8} = 1292.78$)

A linha 19 mostra um logaritmo (base 10) do valor na linha 18 (exemplo, $\log_{10} 1292.8 = 3.112$).

D. Probabilidade para a estimativa aproximada do DL50.

10. Probabilidade é uma medida estatística do quão fortemente os dados suportam uma estimativa da DL50 ou outro parâmetro. Razões de probabilidade podem ser usadas para comparar o quão bem os dados suportam diferentes estimativas da DL50.

11. Na coluna 8, calcular a probabilidade da estimativa de DL50 aproximada do Passo C. A probabilidade (Linha 21) é o produto das contribuições de probabilidade para animais individuais (ver parágrafo 41 da diretriz). A contribuição de probabilidade para o (número do) animal é denotada por L_i.

12. Na coluna 7, inserir a estimativa da probabilidade de resposta na dose d_i, denotada P_i. P_i é calculado a partir de uma curva dose-resposta. Importante observar que os parâmetros de uma curva "probit" dose-resposta são a inclinação e a DL50; portanto, valores são necessários para cada um desses parâmetros. Para a DL50, é utilizada a estimativa da média da dose da linha 18. Para a inclinação neste exemplo, o valor padrão de 2 é usado. As etapas a seguir podem ser usadas para calcular a probabilidade de resposta P_i.

1. Calcule o log base 10 da dose d_i (coluna 6).
2. Para cada animal calcule a pontuação-z (mais conhecido em inglês como z-score), denotado Z_i (não mostrado na tabela), usando a fórmula

   σ = 1 / inclinação,

$Z_i = (2,243 – 3,112) / 0,500 = -1,738$

3. Para a i° (número da) dose a probabilidade estimada de resposta é

   $P_i = F(Z_i)$

   Onde F denota a função de distribuição cumulativa para a distribuição normal padrão (ou seja, a distribuição normal com média 0 e variância 1).

   Por exemplo: (linha 1)

   $P_1 = F(-1,738) = 0,0412$

A função F (ou algo muito próximo) é ordinariamente o dado para a distribuição normal em tabelas estatísticas, mas a função também está amplamente disponível como uma função de planilha. Está disponível sob nomes diferentes, por exemplo: a @NORMAL função de Lotus 1-2-3 (1) e a @NORMDIST função no Excel[2]. Para confirmar que foi usada corretamente a função disponível no programa, é possível verificar valores familiares como $F(1,96) \approx 0,975$ ou $F(1,64) \approx 0,95$.

13. Coluna 8: Calcular o log natural da contribuição de probabilidade ($\ln(L_i)$). L_i é simplesmente a probabilidade da resposta que realmente foi observada para o i (número do) animal:

Animais que respondem: $\ln(L_i) = \ln(P_i)$

Animais que não respondem: $\ln(L_i) = \ln(1 – P_i)$

Note que aqui o logaritmo natural (ln) é usado, enquanto em outros lugares o logaritmo da base 10 (comum) foi usado. Essas escolhas são ordinariamente esperadas em um dado contexto.

Os passos acima são feitos para cada animal. Por último:

Linha 20: Some o log das contribuições de probabilidade na coluna 8.

Linha 21: Calcule a probabilidade aplicando a função experimental aplicada ao valor de log-probabilidade na linha 20 (exemplo, exp(-3,389) = e-3.389 = 0,0337).

E. Calcular probabilidade para dois valores de doses e abaixo da estimativa aproximada.

14. Se os dados permitirem uma estimativa precisa, espera-se que a probabilidade seja alta, se a estimativa for um valor razoável da DL50, em relação às pro-

babilidades para valores distantes dessa estimativa. Comparar a probabilidade à estimativa de média de dose (1.292,8; linha 18) para diferentes valores por um fator de 2,5 daquele valor (ou seja, para 1.292,8*2,5 e 1.292,8/2,5). Os cálculos (mostrados nas colunas 9-12) são obtidos de forma similar àqueles descritos acima, exceto que os valores 517,1 (1.292,8/2,5) e 3232,0 (=1.292,8*5) foram usados para o DL50, ao invés de 1292,8. As probabilidades e log-probabilidades são mostradas nas linhas 20-21.

F. Calcule razão de probabilidade.

15. Os três valores de probabilidade (linha 21) são usados para calcular duas razões de probabilidade (linha 22). Uma razão de probabilidade é usada para comparar o suporte estatístico para a estimativa de 1292,8 ao suporte para cada um dos outros valores, 517,1 e 3.232,0. As duas razões de probabilidade são, portanto:

RP1 = [probabilidade de 1.292,8] / [probabilidade de 517,1]
= 0,0337 / 0,0080
= 4,21

e

RP2 = [probabilidade de 1.292,8] / [probabilidade de 3.232,0]
= 0,0337 / 0,0098
= 3,44

G.Determine se a razão de probabilidade excede o valor crítico.

16. Razões de probabilidade altas indicam alto suporte para o ponto estimado da DL50. Ambos as razões de probabilidade calculadas no passo F (4,21 e 3,44) excedem o valor crítico da razão de probabilidade, que é 2,5. Portanto, o critério de parada da razão de probabilidade é satisfeito e o teste encerrado. Isso é indicado pelo TRUE (verdadeiro) na coluna 24 e uma nota no topo da tabela de exemplo, indicando que o critério de razão de probabilidade (Critério PR) é encontrado.

LITERATURA

(1) Lotus Development Corporation (1999). Lotus 1-2-3. Version 9.5, Millenium Edition. Cambridge, MA, USA.

(2) Microsoft Corporation (1985-1997). Microsoft Excel Version 5.0 or later. Seattle, WA, USA.

Tabela 2

Exemplo de critério de parada (a) usando 2.000mg/kg

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PASSO	**(I)inclui**	**Dose**	**(X) = Responde/ (O) = Não responde**	**Incluido em nominal (n)**	**Dose log_{10}**	**DL50 =**	**#DIV/0!**	**DL50 =**	**#DIV/0!**	**DL50 =**	**#DIV/0!**
	(E)xclui		**OK**			**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**	**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**	**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**
1	I	175	O	NÃO	2,2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	I	550	O	NÃO	2,7404	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	I	2.000	O	NÃO	3,3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	I	2.000	O	NÃO	3,3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	I	2.000	O	NÃO	3,3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	E	Interromper depois do 5o. animal porque 3 animais sobreviveram ao limite de 2.000mg/kg (#3-#5).									
7	E					Ignorar todas as células de cálculo. Sem reversão da direção da resposta					
8	E										
9	E										
10	E										
11	E										
12	E										
13	E										
14	E										
15	E										
Tamanho da amostra nominal = 0											
Número real testado = 5											
Probabilidade máxima calculada da estimativa da DL50 = nenhum						Cálculos da probabilidade máxima não podem ser completados. DL50 é maior que 2.000mg/kg					

Tabela 3

Exemplo de critério de parada (a) usando 5.000mg/kg

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PASSO	**(I) inclui**	**Dose**	**(X) = Responde/ (O) = Não responde**	**Incluido em nominal (n)**	**Dose log_{10}**	**DL50 =**	**#DIV/0!**	**DL50 =**	**#DIV/0!**	**DL50 =**	**#DIV/0!**
	(E) Exclui		**OK**			**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**	**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**	**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**
1	I	175	O	NÃO	2,2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	I	550	O	NÃO	2,7404	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	I	1,750	O	NÃO	3,2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	I	5.000	O	NÃO	3,6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	I	5.000	O	NÃO	3,6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	I	5.000	O	NÃO	3,6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
7	E	Interromper depois do 5o. animal porque 3 animais sobreviveram ao limite de 5.000mg/kg (#4-#6).				Ignorar todas as células de cálculo. Sem reversão da direção da resposta					
8	E										
9	E										
10	E										
11	E										
12	E										
13	E										
14	E										
15	E										
Tamanho da amostra nominal = 0											
Número real testado = 6											
Probabilidade máxima calculada da estimativa da DL_{50} = nenhum						Cálculos da probabilidade máxima não podem ser completados. DL50 é maior que 5.000mg/kg					

Tabela 4

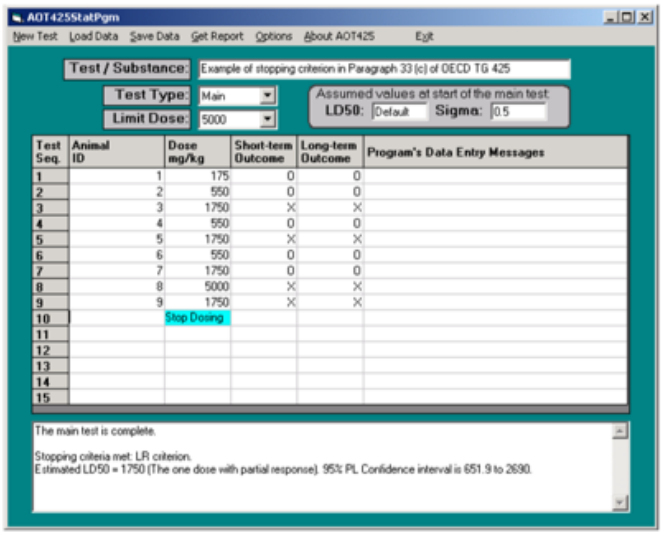
Exemplo de critério de parada (b)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PASSO	**(I)inclui**	**Dose**	**(X) = Respon-de/ (O) = Não responde**	**Incluido em nominal (n)**	**Dose log_{10}**	**DL50 =**	**31,0**	**DL50 =**	**12,4**	**DL50 =**	**77,6**
	(E)Exclui		**OK**			**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabili-dade (P_i)**	**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabili-dade (P_i)**	**Prob. De resposta**	**Contri-buição de probabilida-de (P_i)**
1	I	175	X	NÃO	2.2430	0,9335	- 0,0688	0,9892	- 0,0108	0,7602	- 0,2742
2	I	55	X	SIM	1.7404	0,6905	- 0,3703	0,9020	- 0,1031	0,3826	- 0,9607
3	I	17,5	O	SIM	1.2430	0,3095	- 0,3703	0,6174	- 0,9607	0,0980	- 0,1031
4	I	55	X	SIM	1.7404	0,6905	- 0,3703	0,9020	- 0,1031	0,3826	- 0,9607
5	I	17,5	O	SIM	1.2430	0,3095	- 0,3703	0,6174	- 0,9607	0,0980	- 0,1031
6	I	55	X	SIM	1.7404	0,6905	- 0,3703	0,9020	- 0,1031	0,3826	- 0,9607
7	I	17,5	O	SIM	1.2430	0,3095	- 0,3703	0,6174	- 0,9607	0,0980	- 0,1031
8	E	Parar depois do 7o. animal porque 5 reversões em 6 animais consecuti-vos (#2 - #7)									
9	E										
10	E										
11	E										
12	E										
13	E										
14	E										
15	E										
Tamanho da amostra nominal =				**6**							
Número real testado =				**7**							
Estimador de média de dose				**31,02**							
log_{10} =				**1,492**							
Soma de log - probabilidade:						-2,2906			-3,2021		-3,4655
Probabilidades						0,1012			0,0407		0,0313
Razão da probabilidade									2,4880		3,2378
Razão individual excede valor crítico?				CRÍTICO	2,5				FALSO		VERDADEIRO
Ambas as razões excedem valor crítico?									FALSO		
Probabilidade máxima calculada de estimativa de LD_w =				29,6							
				Estimativa final obtida pelo cálculo de probabili-dade máxima				Cálculo automatizado. Não é importante nesse caso			

Parar quando o critério é encontrado. Aqui no 9º animal. Checar o critério LR a partir do 6º.

Inclinação assumida =2			Sigma = 0,5				Parâmetros de convergência					
							PR crítica		2.5			
Resultado: O critério é encontrado							Fator da DL50		2.5			
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**		**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
PASSO	**(I) inclui**	**Dose**	**(X) = Responde/ (O) = Não responde**	**Incluído em nominal (n)**	**Dose log_{10}**	**Cont. para DAE**	**DL50 =**	**1292,8**	**DL50 =**	**517,1**	**DL50 =**	**3232,0**
	(E) Exclui		**OK**				**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**	**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**	**Prob. De resposta**	**Contribuição de probabilidade (P_i)**
1	I	175	O	NÃO	2,2430	0,0000	0,0412	-0,0421	0,1733	-0,1903	0,0057	-0,0057
2	I	550	O	SIM	2,7404	2,7404	0,2289	-0,2600	0,5214	-0,7368	0,0620	-0,0640
3	I	1.750	X	SIM	3,2430	3,2430	0,6037	-0,5046	0,8552	-0,1564	0,2971	-1,2138
4	I	550	O	SIM	2,7404	2,7404	0,2289	-0,2600	0,5214	-0,7368	0,0620	-0,0640
5	I	1.750	X	SIM	3,2430	3,2430	0,6037	-0,5046	0,8552	-0,1564	0,2971	-1,2138
6	I	550	O	SIM	2,7404	2,7404	0,2289	-0,2600	0,5214	-0,7368	0,0620	-0,0640
7	I	1.750	O	SIM	3,2430	3,2430	0,6037	-0,9257	0,8552	-1,9323	0,2971	-0,3525
8	I	5.000	X	SIM	3,6990	3,6990	0,8800	-0,1279	0,9756	-0,0247	0,6477	-0,4344
9	I	1.750	X	SIM	3,2430	3,2430	0,6037	-0,5046	0,8552	-0,1564	0,2971	-1,2138
10	E	Parar quando o critério é encontrado. Aqui é no 9o. animal. Checar o critério PR a partir do 6o. animal				0,0000						
11	E					0,0000						
12	E					0,0000						
13	E					0,0000						
14	E					0,0000						
15	E					0,0000						
Tamanho da amostra nominal =				**8**								
Número real testado =				**9**								
Estimador de média de dose				**1292,78**								
log_{10} =				**3,112**								
Soma de log - probabilidade:								-3,3894		-4,82870		-4,6260
Probabilidades								0,0337		0,0080		0,0098
Razão da probabilidade										4,2104		
Razão individual excede valor crítico?				CRÍTICO	2,5					Verdadeiro		Verdadeiro
Ambas as razões excedem valor crítico?										Verdadeiro		Verdadeiro
Probabilidade máxima calculada de estimativa de LD50 =						1329,6		Estimativa final obtida pelo cálculo de probabilidade máxima				

Tabela 6. Exemplo de critério de parada (c) do Software auto auto contido para as diretrizes OECD 425



ANEXO 4

Critérios para classificação de substâncias de teste com valor DL50 esperado escedendo 2.000Mg/kg sem precisar testar.

1. Critérios para categoria 5 de risco destinam-se a permitir a identificação de substâncias de testes que têm relativamente baixo risco de toxicidade aguda, mas que, sob certas circunstâncias talvez apresentem um perigo para populações vulneráveis. Essas substâncias são previstas para ter um DL50 oral ou dérmico entre 2.000-5.000mg/kg ou equivalentes doses por outras vias. A substância teste pode ser classificada na categoria de risco definida por: 2.000mg/kg <DL50<5.000mg/kg (Categoria 5 no GHS) nos seguintes casos:

a) Se evidências confiáveis, que já estejam disponíveis para indicar que o DL50 está na categoria 5; ou se outro estudo animal ou efeitos tóxicos em humanos indicarem uma preocupação por conta de saúde humana de uma natureza aguda.

b) Por extrapolação, estimação ou medida de dados se uma atribuição a outra categoria de perigo não for garantida e:

- Informação confiável está disponível indicando efeitos tóxicos significante em humanos; ou
- Alguma mortalidade for observada quando testada com valores de categoria 4 por via oral; ou
- Quando julgamento de profissionais confirmarem significantes sinais clínicos de toxicidade quando testados sob valores de categoria 4, exceto diarreia, pilo-ereção ou uma aparência ruim; ou
- Quando o julgamento de um especialista confirmar informações confiáveis indicando o potencial para um efeito agudo significante por outro estudo com animais.

TESTANDO DOSES ACIMA DE 2.000mg/kg

2. Reconhecendo a necessidade de proteger o bem-estar animal, testando a 5.000mg/kg é desencorajado e deveria ser considerado apenas há uma forte probabilidade de os resultados mostrarem uma relevância direta para proteger saúde humana e animal.

Adotado: 29 de julho de 2016

Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 487

Teste de micronúcleos em células de mamíferos in vitro

INTRODUÇÃO

1. A Diretriz da OECD para o Teste de Substâncias Químicas é atualizada periodicamente, à luz do progresso científico, das mudanças nas necessidades regulatórias e das considerações de bem-estar animal. A Diretriz (TG) 487 original foi adotada em 2010. O contexto geral foi atualizado, com uma revisão das Diretrizes da OECD sobre genotoxicidade e refletindo os vários anos de experiência com testes e interpretação de dados. Esta Diretriz faz parte de uma série de guias em toxicologia genética. Foi desenvolvido um documento que fornece informações sucintas sobre os testes de toxicologia genética e uma visão geral das mudanças recentes feitas nestas Diretrizes[1].

2. O teste do micronúcleo *in vitro* (MNvit) é um teste de genotoxicidade para a detecção de micronúcleos (MN) no citoplasma de células em interfase. Os micronúcleos podem se originar de fragmentos cromossômicos acêntricos (isto é, sem um centrômero) ou de cromossomos inteiros que são incapazes de migrar para os polos durante o estágio de anáfase da divisão celular. Portanto, o teste MNvit é um método *in vitro* que fornece uma base abrangente para investigar o potencial danoso de cromossomos *in vitro*, porque os aneugenos e os clastógenos podem ser detectados[2-3] em células que sofreram divisão celular, durante ou após a exposição à substância química em teste (veja o parágrafo 13 para mais detalhes). Os micronúcleos representam danos que foram transmitidos às células filhas, enquanto as aberrações cromossômicas marcadas nas células da metáfase podem não ser transmitidas. Em ambos os casos, as alterações podem não ser compatíveis com a sobrevivência da célula.

3. Esta Diretriz permite o uso de protocolos com e sem o inibidor de polimerização de actina citocalasina B (cytoB). A adição de citocromo B antes da mitose resulta em células que são binucleadas e, portanto, permite a identificação e a análise de micronúcleos apenas nas células que completaram uma mitose[4-5]. Esta Diretriz também permite o uso de protocolos sem bloqueio de citocinese, desde que haja evidências de que a população de células analisadas tenha sofrido mitose.

4. Além de usar o teste MNvit para identificar substâncias que induzem micronúcleos, o uso de marcação imunocitoquímica de cinetócoros, ou hibridação com sondas centroméricas/teloméricas (hibridização *in situ* fluorescente – FISH, em inglês), também pode fornecer informações adicionais sobre os mecanismos de dano cromossômico e formação de micronúcleos[6-17]. Esses procedimentos de rotulagem e hibridização podem ser usados quando há aumento na formação de micronúcleos e o investigador deseja determinar se esse aumento foi o resultado de eventos clastogênicos e/ou aneugênicos.

5. Como os micronúcleos nas células em interfase podem ser avaliados com relativa objetividade, o operador de laboratório só precisa determinar o número de células binucleadas quando o cytoB é usado e há incidência de células micronucleadas, em todos os casos. Como resultado, os diapositivos (*slides*) podem ser pontuados com alguma rapidez e a análise pode ser automatizada. Isso torna prático marcar milhares, em vez de centenas, de células por tratamento, aumentando o poder do teste. Finalmente, como os micronúcleos podem surgir de cromossomas lentos, existe o potencial para detectar agentes indutores de aneuploidia que são difíceis de estudar em testes convencionais de aberrações cromossômicas, como o previsto na Diretriz OECD 473[18]. No entanto, o teste MNvit, tal como descrito nesta Diretriz, não permite a diferenciação de substâncias indutoras de alterações no número de cromossomas e/ou ploidia das que induzem a clastogenicidade sem técnicas especiais – como o FISH mencionado no parágrafo 4.

6. O teste MNvit é robusto e pode ser realizado em vários tipos de células, na presença ou na ausência de cytoB. Existem dados extensos para apoiar a validade do teste MNvit usando vários tipos de células (culturas de linhagens celulares ou culturas de células primárias)[19-36]. Esses incluem, em particular, os estudos internacionais de validação coordenados pela Sociedade Francesa de Toxicologia Genética (SFTG)[19- 23] e os relatórios do Workshop Internacional sobre Testes de Genotoxicidade[5;17]. Os dados disponíveis também foram reavaliados em um estudo retrospectivo de validação com base em evidência, pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), da Comissão Europeia (CE), e o método de teste foi endossado como cientificamente válido pelo Comitê Consultivo Científico do CEVMA (CEAE)[37-39].

7. O teste MNvit de células de mamífero pode empregar culturas de linhagens celulares ou culturas celulares primárias, de origem humana ou de roedor. Como

a frequência de fundo dos micronúcleos influenciará a sensibilidade do teste, recomenda-se a utilização de tipos de células com uma frequência de formação de micronúcleos estável e definida. As células utilizadas são selecionadas com base em sua capacidade de crescer bem em cultura, estabilidade de seu cariótipo (incluindo o número de cromossomos) e frequência espontânea de micronúcleos[40]. Atualmente, os dados disponíveis não permitem que recomendações firmes sejam feitas, mas sugerem que é importante, ao avaliar riscos químicos, considerar o *status* de *p53*, a estabilidade genética (cariótipo), a capacidade de reparo de DNA (roedores *versus* humanos) e a origem das células escolhidas para teste. Os usuários desta Diretriz são, portanto, encorajados a considerar a influência dessas e de outras características celulares no desempenho de uma linhagem celular na detecção da indução de micronúcleos, à medida que o conhecimento evolui nessa área.

8. As definições utilizadas são fornecidas no anexo 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

9. Testes realizados *in vitro* geralmente requerem o uso de uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que as células sejam metabolicamente competentes em relação às substâncias de teste. O sistema de ativação metabólica exógena não imita inteiramente as condições *in vivo*. Deve-se tomar cuidado para evitar condições que possam levar a resultados positivos que não reflitam a genotoxicidade das substâncias químicas testadas. Tais condições incluem alterações no pH[41-43] ou osmolalidade, interação com o meio de cultura de células[44-45] ou níveis excessivos de citotoxicidade – ver parágrafo 29.

10. Para analisar a indução de micronúcleos, é essencial que a mitose tenha ocorrido em culturas tratadas e não tratadas. O estágio mais informativo para contagem de micronúcleos é em células que completaram uma mitose durante ou após o tratamento com a substância química em estudo. Para nanomateriais manufaturados, são necessárias adaptações específicas desta Diretriz – as quais não são descritas aqui.

11. Antes de usar a Diretriz em uma mistura, para gerar dados com finalidade regulatória, deve-se considerar se e por que ele pode fornecer resultados ade-

quados para essa finalidade. Tais considerações não são necessárias, quando há exigência regulamentar para o teste da mistura.

PRINCÍPIO DO TESTE

12. Culturas de células de origem humana ou de outros mamíferos são expostas à substância química em estudo, com e sem uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que sejam utilizadas células com capacidade metabólica adequada (ver parágrafo 19).

13. Durante ou após a exposição à substância química em teste, as células são cultivadas por período suficiente para permitir que o dano cromossômico e/ou outros efeitos no ciclo celular/divisão celular levem à formação de micronúcleos em células em interfase. Para indução de aneuploidia, a substância química em teste deve estar normalmente presente durante a mitose. As células da interfase colhidas e coradas são analisadas quanto à presença de micronúcleos. Idealmente, os micronúcleos só devem ser marcados nas células que completaram a mitose durante a exposição à substância química em teste ou durante o período pós-tratamento, se for usada. Em culturas que foram tratadas com um bloqueador de citocinese, isto é facilmente conseguido, marcando apenas células binucleadas. Na ausência de um bloqueador de citocinese, é importante demonstrar que as células analisadas provavelmente sofreram divisão celular, com base no aumento na população de células, durante ou após a exposição à substância química em teste. Para todos os protocolos, é importante demonstrar que a proliferação celular ocorreu, tanto no controle quanto nas culturas tratadas, e a extensão da citotoxicidade ou da citostase induzida pelo teste químico deve ser avaliada em todas as culturas classificadas para micronúcleos.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Células

14. Linfócitos primários humanos cultivados, ou de sangue periférico[7;20;46-47] de outros mamíferos, e linhagens celulares de roedores, tais como células CHO, V79, CHL/IU e L5178Y, ou linhagens celulares humanas, tais como TK6, podem ser utilizados[19-23;26-29;31;33-36] (ver parágrafo 6). Outras linhagens celulares, como HT29[48], Caco-2[49], HepaRG[50-51], células HepG2[52-53], A549 e células primárias de embrião

de hamster sírio[54] foram utilizadas para testes de micronúcleos, mas ainda não estão extensivamente validados. Portanto, o uso dessas linhagens e tipos de células deve ser justificado com base no seu desempenho demonstrado no teste, conforme descrito na seção Critérios de Aceitação. O cytoB foi relatado como potencialmente causador de impacto no crescimento celular de L5178Y e, portanto, não é recomendado nesta linhagem celular[23]. Quando células primárias são utilizadas, por razões de bem-estar animal, o uso de células de origem humana deve ser considerado, sempre que viável, e amostrado de acordo com os princípios e regulamentos éticos humanos.

15. Os linfócitos do sangue periférico humano devem ser obtidos de jovens (aproximadamente 18-35 anos de idade), indivíduos não fumantes, sem doença conhecida ou exposições recentes a agentes genotóxicos (por exemplo, produtos químicos, radiação ionizante), em níveis que aumentariam a incidência de fundo de células micronucleadas. Isso garante que a incidência de células micronucleadas seja baixa e consistente. A incidência basal de células micronucleadas aumenta com a idade e esta tendência é mais marcante em mulheres do que em homens[55]. Se células de mais de um doador são agrupadas para uso, o número de doadores deve ser especificado. É necessário demonstrar que as células se dividiram desde o início do tratamento com a substância química em teste para a amostragem celular. As culturas de células são mantidas numa fase de crescimento exponencial (linhagens celulares) ou estimuladas a dividir (culturas primárias de linfócitos), para expor as células em diferentes fases do ciclo celular, uma vez que a sensibilidade dos estágios celulares às substâncias de teste pode não ser conhecida. Há células primárias que necessitam ser estimuladas com agentes mitogênicos para se dividir e, em geral, são sincronizadas durante a exposição à substância química de teste (por exemplo, linfócitos humanos após estimulação mitogênica de 48 horas). O uso de células sincronizadas durante o tratamento com a substância química em teste não é recomendado, mas pode ser aceitável, se justificado.

Meio e condições de cultura

16. O meio de cultura apropriado e as condições de incubação (recipientes de cultura, atmosfera umidificada de 5% de CO_2, se apropriado, temperatura de 37ºC), devem ser usados para manter as culturas. As linhagens celulares devem ser verificadas rotineiramente, quanto à estabilidade do número cromossômico modal e à ausência de contaminação por *Mycoplasma*. As células não devem ser usadas se contaminadas

ou se o número modal de cromossomos mudar. O tempo normal do ciclo celular das linhagens celulares ou das culturas primárias utilizadas no laboratório de testes deve ser estabelecido e deve ser consistente com as características celulares publicadas.

Preparação de culturas

17. Linhagens celulares: as células são propagadas a partir de culturas em estoque, semeadas em meio de cultura à densidade tal que as células em suspensões ou em monocamadas continuarão a crescer exponencialmente até o tempo de coleta (confluência deve ser evitada para células crescendo em monocamadas).

18. Linfócitos: sangue total tratado com um anticoagulante (como heparina), ou linfócitos separados, são cultivados (48 horas para linfócitos humanos) na presença de um mitógeno (como fito-hemaglutinina (PHA) para linfócitos humanos) para induzir a divisão celular antes da exposição à substância química em estudo e ao cytoB.

Ativação Metabólica

19. Os sistemas de metabolização exógena devem ser utilizados quando se empregam células com capacidade metabólica endógena inadequada. O sistema mais comumente recomendado por padrão, a menos que outro sistema seja justificado, é uma fração pós-mitocondrial suplementada com cofator (S9), preparada a partir do fígado de roedores (geralmente camundongos) tratados com agentes indutores de enzimas – como Aroclor 1254[56-57] ou uma combinação de fenobarbital e β-naftoflavona[58-60]. Esta última combinação não conflita com a Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes[61] e demonstrou ser tão eficaz quanto o Aroclor 1254 para a indução de oxidases de função mista[58-60]. A fração S9 é tipicamente utilizada em concentrações que variam de 1 a 2% (v/v), mas pode ser aumentada para 10% (v/v) no meio de teste final. O uso de produtos que reduzem o índice mitótico, especialmente produtos de complexação de cálcio[62], deve ser evitado durante o tratamento. A escolha do tipo e da concentração do sistema de ativação metabólica exógeno ou do indutor metabólico empregado pode ser influenciada pela classe de substâncias testadas.

Preparação da substância química em teste

20. Substâncias químicas em teste sólidas devem ser preparadas em solventes apropriados e diluídas, se adequado, antes do tratamento das células. As substâncias químicas de teste líquidas podem ser adicionadas diretamente ao sistema de

teste e/ou diluídas antes do tratamento do sistema de teste. Substâncias químicas de teste gasosas ou voláteis devem ser testadas por modificações nos protocolos padrão, como tratamento em vasos selados[63-65]. As preparações da substância química em teste devem ser preparadas imediatamente antes do tratamento, a menos que os dados de estabilidade demonstrem a aceitabilidade do armazenamento.

Condições de teste

Solventes

21. O solvente deve ser escolhido de forma a otimizar a solubilidade das substâncias químicas em teste sem afetar adversamente a condução do ensaio; ou seja, sem alterar o crescimento celular, afetando a integridade da substância química em teste, reagindo com os frascos de cultura ou prejudicando o sistema de ativação metabólica. Recomenda-se que, sempre que possível, a utilização de um solvente aquoso (ou meio de cultura) seja considerada em primeiro lugar. Os solventes bem estabelecidos são a água ou o dimetilsulfóxido (DMSO). Geralmente, os solventes orgânicos não devem exceder 1% (v/v). Se o citocromo B for dissolvido em DMSO, a quantidade total de solvente orgânico, utilizado para a substância química em estudo e para o cytoB, não deve exceder 1% (v/v). Caso contrário, controles não tratados devem ser usados para garantir que a porcentagem de solvente orgânico não tenha efeito adverso. Os solventes aquosos (solução salina ou água) não devem exceder 10% (v/v) do meio de tratamento final. Se forem utilizados outros solventes que não sejam bem estabelecidos (etanol ou acetona), a sua utilização deve ser suportada por dados que indiquem a sua compatibilidade com a substância química em estudo, o sistema de teste e a sua falta de toxicidade genética à concentração utilizada. Na ausência desses dados de suporte, é importante incluir controles não tratados (ver anexo 1), bem como controles com solvente, para demonstrar que não são induzidos efeitos deletérios ou cromossômicos (aneuploidia ou clastogenicidade) pelo solvente escolhido.

Uso de cytoB como bloqueador de citocinese

22. Uma das considerações mais importantes no desempenho do teste MNvit é assegurar que as células que estão sendo avaliadas tenham concluído a mitose durante o tratamento ou o período de incubação pós-tratamento, se for utilizada. A contagem de micronúcleos, portanto, deve ser limitada a células que passaram por mitose durante o tratamento. O CytoBistea é o agente mais amplamente usado para bloquear as citocinas, porque inibe a montagem da actina e, portanto, impede

a separação das células filhas após a mitose, levando à formação de células binucleadas[6;66-67]. O efeito do teste químico na cinética de proliferação celular pode ser medido simultaneamente, quando o cytoB é usado. CytoB deve ser utilizado como um bloqueador de citocinese quando linfócitos humanos são usados, pois os tempos do ciclo celular serão variáveis entre doadores e porque nem todos os linfócitos responderão à estimulação com PHA. CytoB não é obrigatório para outros tipos de células, se for possível estabelecer que foram submetidas à divisão, conforme descrito no parágrafo 27. Além disso, CytoB não é usado quando as amostras são avaliadas para micronúcleos utilizando métodos de citometria de fluxo.

23. A concentração apropriada de cytoB deve ser determinada pelo laboratório para cada tipo de célula, buscando alcançar ótima frequência de células binucleadas, nas culturas de controle de solvente, e produzir bom rendimento de células binucleadas para classificação nos escores. A concentração apropriada de cytoB é geralmente entre 3 e 6μg/ml[19].

Medição da proliferação celular e da citotoxicidade: escolha das concentrações do tratamento

24. Ao determinar a concentração química de ensaio mais elevada, devem ser evitadas as dosagens com capacidade de produzir respostas positivas, tais como: as que produzem citotoxicidade excessiva (ver parágrafo 29), as precipitação no meio de cultura (ver parágrafo 30) e as alterações marcadas no pH ou mesmo osmolalidade (ver parágrafo 9). Se a substância química em estudo provocar alteração acentuada no pH do meio, no momento da adição, o pH pode ser ajustado por tamponamento durante o tratamento final, de modo a evitar resultados positivos artificiais e para manter condições de cultura apropriadas.

25. Medidas de proliferação celular são feitas para assegurar que a quantidade suficiente de células tratadas tenha sido submetida à mitose durante o teste e que os tratamentos são conduzidos em níveis apropriados de citotoxicidade (ver parágrafo 29). A citotoxicidade deve ser determinada na experiência principal com e sem ativação metabólica, utilizando uma indicação apropriada de morte e crescimento celular (ver parágrafos 26 e 27). Embora a avaliação da citotoxicidade em um teste preliminar inicial possa ser útil para definir melhor as concentrações a serem usadas no experimento principal, um teste inicial não é obrigatório. Se realizado, não deve substituir a medição da citotoxicidade no experimento principal.

26. O tratamento de culturas com cytoB e a medição das frequências relativas de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas na cultura fornecem um método preciso para quantificar o efeito sobre a proliferação celular e a atividade citotóxica ou citostática de um tratamento[6] e asseguram que apenas as células que se dividiram durante ou após o tratamento são marcadas microscopicamente. Recomenda-se o índice de proliferação de bloqueadores de citocinese (CBPI, em inglês)[6;27;68] ou o Índice de Replicação (IR) de, pelo menos, 500 células por cultura (ver fórmulas do anexo 2), para estimar a atividade citotóxica e citostática de um tratamento, comparando os valores nas culturas tratadas e no controle. A avaliação de outros indicadores de citotoxicidade (por exemplo, integridade celular, apoptose, necrose, contagem de metáfase, ciclo celular) pode fornecer informações úteis, mas não deve ser usada no lugar de CBPI ou RI.

27. Em estudos sem cytoB, é necessário demonstrar que as células em cultura se dividiram, de modo que uma proporção substancial das células marcadas sofreu divisão durante ou após o tratamento com a substância química em estudo. Caso contrário, respostas falsas negativas podem ser produzidas. Recomenda-se a medição da duplicação relativa da população (RPD, em inglês) ou o aumento relativo da contagem de células (RICC, em inglês) para estimar a atividade citotóxica e citostática de um tratamento[17;68-71] (ver anexo 2 para Fórmulas). Em períodos prolongados de amostragem (por exemplo, tratamento para 1,5-2 ciclos normais de comprimento celular e coleta após 1,5-2 ciclos normais, levando a períodos maiores do que 3-4 ciclos normais no total, como descrito nos parágrafos 38 e 39), RPD pode subestimar a citotoxicidade[71]. Nestas circunstâncias, o RICC pode ser uma medida melhor – ou a avaliação da citotoxicidade após um ciclo normal de 1,5-2 pode ser uma estimativa útil. A avaliação de outros marcadores para citotoxicidade ou citostase (por exemplo, integridade celular, apoptose, necrose, contagem de metáfase, índice de proliferação (IP), ciclo celular, pontes nucleoplásmicas ou gemas nucleares) poderia fornecer informações adicionais úteis, mas não deve ser usada no lugar de RPD ou RICC.

28. Pelo menos, três concentrações de teste (não incluindo o solvente e os controles positivos) que satisfaçam os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade apropriada, número de células, etc.) devem ser avaliadas. Quaisquer que sejam os tipos de células (linhagens celulares ou culturas primárias de linfócitos) podem ser utilizadas culturas replicadas ou únicas em cada concentração testada. Embora o uso de culturas duplicadas seja aconselhável, culturas únicas também são aceitá-

veis desde que o mesmo número total de células seja classificado: para culturas simples ou duplicadas. O uso de culturas únicas é particularmente relevante quando mais de 3 concentrações são avaliadas (ver parágrafos 44-45). Os resultados obtidos a partir das culturas replicadas independentes a uma determinada concentração podem ser agrupados para a análise de dados. Para substâncias químicas em teste, que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, os intervalos de concentração de aproximadamente 2 a 3 vezes serão geralmente apropriados. Quando a citotoxicidade ocorre, as concentrações de ensaio selecionadas devem abranger um intervalo, desde a produção da citotoxicidade, tal como descrito no parágrafo 29, e incluindo concentrações nas quais haja moderada, pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitas substâncias químicas de teste exibem curvas de resposta de concentração acentuada e, para obter dados em citotoxicidade baixa e moderada ou para estudar a relação dose-resposta em detalhes, será necessário usar concentrações mais próximas e/ou mais de três concentrações (culturas únicas ou réplicas), em particular em situações em que é necessária repetir a experiência (ver parágrafo 60).

29. Se a concentração máxima for baseada na citotoxicidade, a concentração mais alta deve ter como objetivo atingir 55 ± 5% de citotoxicidade, usando os parâmetros recomendados (isto é, redução de RICC e RPD para linhagens celulares, quando cytoB não é utilizado, e redução de CBPI ou IR, quando cytoB é usado para 45 ± 5% do controle negativo simultaneamente)[72]. Deve-se ter cuidado ao interpretar os resultados positivos encontrados apenas no limite superior da faixa de citotoxicidade de 55 ± 5%[71].

30. Para os testes com substâncias químicas pouco solúveis, que não são citotóxicas em concentrações menores do que a menor concentração insolúvel, a maior concentração analisada deve produzir turbidez ou um precipitado – visível a olho nu ou com o auxílio de um microscópio invertido – no final do tratamento com a substância química. Mesmo que a citotoxicidade ocorra acima da concentração insolúvel mais baixa, é aconselhável testar em apenas uma concentração que induza turbidez ou com precipitado visível, porque podem resultar efeitos de artefato do precipitado. Na concentração que produz um precipitado, deve-se ter o cuidado de assegurar que o mesmo não interfira na condução do teste (por exemplo, coloração ou pontuação). A determinação da solubilidade no meio de cultura antes da experiência pode ser útil.

31. Se nenhum precipitado ou citotoxicidade limite for observado, a concentração de teste mais alta deverá corresponder ao menor valor entre 10mM, 2mg/mL ou 2μl/m[73-75]. Quando a substância química em teste não for de composição definida, como uma substância de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexa ou materiais biológicos (por exemplo, UVCBs)[76], extratos ambientais, etc., a concentração superior pode precisar ser maior (por exemplo, 5mg/ml) na ausência de citotoxicidade suficiente, para aumentar a concentração de cada um dos componentes. Deve-se notar, no entanto, que esses requisitos podem diferir para medicamentos humanos[93].

Controles

32. Devem ser incluídos, simultaneamente, controles negativos (ver parágrafo 21), consistindo apenas em solvente no meio de tratamento e processados da mesma forma que as culturas de tratamento, para cada período de coleta.

33. São necessários controles positivos concorrentes, para demonstrar a capacidade do laboratório em identificar clastógenos e aneugenos, sob as condições da diretriz usada e a eficácia do sistema de ativação metabólica exógena (quando aplicável). Exemplos de controles positivos são dados na tabela 1. Substâncias alternativas de controle positivo podem ser usadas, se justificadas.

34. Atualmente, não são conhecidos aneugenos que necessitem de ativação metabólica para sua atividade genotóxica[17]. Os testes *in vitro* com células de mamíferos para toxicidade genética são padronizados para os tratamentos de curto prazo, realizados simultaneamente e sem ativação metabólica, com a mesma duração do tratamento. Desta forma, o uso de controles positivos pode ser limitado a um clastógeno que requer ativação metabólica. Neste caso, uma única resposta de controle positivo clastogênico demonstrará a atividade do sistema de ativação metabólica e a capacidade de resposta do sistema de teste. No entanto, o tratamento em longo prazo (sem S9) deve ter o seu próprio controle positivo, uma vez que a duração do tratamento será diferente do teste com ativação metabólica. Se um clastógeno for selecionado como o único controle positivo para tratamento em curto prazo, com e sem ativação metabólica, um aneugeno deve ser selecionado para o tratamento em longo prazo sem ativação metabólica. Controles positivos para clastogenicidade e aneugenicidade devem ser usados em células metabolicamente competentes que não requerem S9.

35. Cada controle positivo deve ser usado em uma ou mais concentrações para dar aumentos reprodutíveis e detectáveis em relação ao fundo, a fim de demonstrar a sensibilidade do sistema de teste (isto é, os efeitos são claros, mas não revelam imediatamente a identidade das lâminas codificadas ao leitor), e a resposta não deve ser comprometida por citotoxicidade que exceda os limites especificados nesta Diretriz.

Tabela 1. Substâncias de referência recomendadas para avaliar a proficiência laboratorial e para a seleção de controles positivos

Categoria	Substância	CASRN
1. Clastógenos ativos sem ativação metabólica	Metanossulfonato de metilo	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	4-Nitroquinolina-N-Óxido	56-57-5
	Arabinoside da citosina	147-94-4
2. Clastógenos que requerem ativação metabólica	Benzo (a) pireno	50-32-8
	Ciclofosfamida	50-18-0
3. Aneugenos	Colquicina	64-86-8
	Vinblastina	143-67-9

PROCEDIMENTO

Programação de Tratamento

36. Para maximizar a probabilidade de detecção de uma aneugenia ou clastogenia que atue em um estágio específico do ciclo celular, é importante que um número suficiente de células, representando a variedade de todos os estágios de seus ciclos celulares, seja tratado com a substância química em teste. Todos os tratamentos devem começar e terminar enquanto as células crescem exponencialmente e devem continuar crescendo até o momento da amostragem. O cronograma de tratamento pode diferir um pouco, tanto para linhagens celulares e culturas primárias de células, como para linfócitos que requerem estimulação mitogênica para iniciar seu ciclo celular[17]. Para os linfócitos, a abordagem mais eficiente é iniciar o tratamento com a substância química testada em 44 a 48 horas após a estimulação com PHA, quando as células se dividirão de forma assíncrona[6].

37. Dados publicados[19] indicam que a maioria dos aneugenos e clastógenos será detectada por curto período de tratamento, de 3 a 6 horas, na presença e na au-

sência de S9, seguido da remoção da substância química em teste e da amostragem no tempo equivalente a cerca de 1,5 a 2,0 ciclos normais de comprimento de células, após o início do tratamento[7].

38. Para uma avaliação minuciosa, que seria necessária para concluir um resultado negativo, as três condições experimentais seguintes devem ser conduzidas, utilizando um tratamento de curta duração, com e sem ativação metabólica, e um tratamento, prolongado sem ativação metabólica (ver parágrafos 56, 57 e 58):

- As células devem ser expostas à substância química em estudo, sem a ativação metabólica, durante 3-6 horas e amostradas em tempo equivalente a cerca de 1,5 a 2,0 ciclos normais após o início do tratamento[19]
- As células devem ser expostas à substância química em estudo, com ativação metabólica, por 3-6 horas e amostradas no tempo equivalente a cerca de 1,5 a 2,0 ciclos normais após o início do tratamento[19]
- As células devem ser continuamente expostas, sem ativação metabólica, até a amostragem, no tempo equivalente a cerca de 1,5 a 2,0 ciclos normais de duração do ciclo celular

No caso de qualquer uma das condições experimentais acima levar a uma resposta positiva, pode não ser necessário investigar qualquer um dos outros regimes de tratamento.

Se for conhecido ou se houver suspeita de que a substância química em estudo afeta o tempo de ciclo celular (por exemplo, ao testar análogos de nucleosídeos), especialmente para células competentes p53[35-36;77], os períodos de amostragem ou recuperação podem ser prolongados até 1,5 - 2,0 comprimentos normais do ciclo celular (total de 3,0 a 4,0 ciclos de comprimento de células após o início de tratamentos de curto e longo prazos). Essas opções abordam situações em que pode haver preocupação com possíveis interações entre a substância química em teste e o cytoB. Quando se utilizam períodos de amostragem prolongados (quando o tempo de cultura total dos comprimentos dos ciclos celulares é de 3,0 a 4,0), deve-se ter o cuidado de assegurar que as células ainda estão se dividindo ativamente. Por exemplo, para os linfócitos, o crescimento exponencial pode estar declinando às 96 horas após a estimulação e as culturas em monocamada das células podem se tornar confluentes.

39. Os esquemas de tratamento celular sugeridos estão resumidos na tabela 2.

Estes esquemas de tratamento geral podem ser modificados (e devem ser justificados), dependendo da estabilidade ou da reatividade da substância química em teste ou das características particulares de crescimento das células utilizadas.

Tabela 2. Tratamento celular e períodos de coleta para o MNvit teste

Linfócitos, células primárias e linhagens celulares tratadas com cytoB	+ S9 Tratamento breve	Tratar por 3-6 horas na presença de S9; remova o S9 e o meio de tratamento; adicione meio fresco e cytoB; coleta 1.5 - 2.0 comprimentos normais do ciclo celular após o início do tratamento.
	- S9 Tratamento breve	Tratar por 3-6 horas; remover o meio de tratamento; adicione meio fresco e cytoB; coleta 1.5 - 2.0 comprimentos normais do ciclo celular após o início do tratamento.
	- S9 Tratamento prolongado	Trate por 1,5 a 2 comprimentos normais de ciclo celular na presença de cytoB; coleta no final do período de tratamento.
Linhas celulares tratadas sem cytoB (Idênticas aos esquemas de tratamento descritos acima, com a exceção de que nenhum cytoB é adicionado)		

40. Para culturas em monocamada, as células mitóticas (identificáveis como sendo redondas e destacadas da superfície) podem estar presentes no final do tratamento de 3-6 horas. Como essas células mitóticas são facilmente destacadas, elas podem ser perdidas quando o meio, contendo a substância química em teste, é removido. Se houver evidência de aumento substancial no número de células mitóticas em comparação com controles, indicando provável parada mitótica, as células devem ser coletadas por centrifugação e adicionadas de volta à cultura, para evitar a perda de células, que estão em mitose, e risco de aberração de micronúcleos/cromossomos, no momento da coleta.

Coleta de células e preparação de lâminas

41. Cada cultura deve ser coletada e processada separadamente. A preparação de células pode envolver tratamento hipotônico, mas essa etapa não é necessária se o espalhamento celular adequado for alcançado. Diferentes técnicas podem ser usadas na preparação de lâminas, desde que sejam obtidas preparações de células de alta qualidade para a pontuação. Células com membrana celular e citoplasma intactos devem ser retidas para permitir a detecção de micronúcleos e (no método de bloqueio de citocinese) a identificação confiável de células binucleadas.

42. As lâminas podem ser coradas usando-se vários métodos, como Giemsa ou corantes específicos para DNA fluorescente. A utilização de manchas fluorescentes apropriadas (por exemplo, laranja de acridina[78] ou Hoechst 33258 mais pironina-Y[79]) pode eliminar alguns dos artefatos associados à utilização de coloração não específica para o DNA.

Podem-se usar anticorpos anticinetocoros, FISH com sondas pancentroméricas de DNA ou marcados *in situ com* primers pancentroméricos específicos, juntamente com o removedor de cor do DNA, para identificar o conteúdo de micronúcleos se a informação mecanicista de sua formação for de interesse (note-se que cromossomos inteiros serão corados enquanto fragmentos de cromossomos acêntricos, não)[16-17]. Outros métodos para diferenciação entre clastogênicos e aneugenos podem ser usados se tiverem demonstrado ser eficazes e validados. Por exemplo, para certas linhagens celulares, as medições de núcleos sub-2N, como eventos hipodiploides usando técnicas como análise de imagens, citometria de varredura a *laser* ou citometria de fluxo, também podem fornecer informações úteis[80-82]. Observações morfológicas de núcleos também podem dar indicações de possível aneuploidia. Além disso, um teste para aberrações cromossômicas em metáfase, preferencialmente no mesmo tipo de célula e protocolo com sensibilidade comparável, também pode ser uma maneira útil de se determinar se os micronúcleos são devidos à quebra do cromossomo (sabendo-se que a perda cromossômica não seria detectada no teste de aberração cromossômica).

Análise

43. Todas as lâminas, incluindo as do solvente e dos controles não tratados (se utilizados) e positivos devem ser codificadas independentemente, antes da análise microscópica das frequências dos micronúcleos. Técnicas apropriadas devem ser usadas para controlar qualquer desvio ou viés ao se usar um sistema de pontuação automatizado, por exemplo, citometria de fluxo, citometria de varredura a *laser* ou análise de imagem. Independentemente da plataforma automatizada usada para enumerar micronúcleos, o CBPI, o RI, o RPD ou o RICC devem ser avaliados simultaneamente.

44. Em culturas tratadas com cytoB, as frequências de micronúcleos devem ser analisadas em, pelo menos, 2.000 células binucleadas, por concentração e controle[83], igualmente divididas entre as réplicas, se réplicas forem usadas. No caso

de culturas únicas por dose (ver parágrafo 28), pelo menos 2.000 células binucleadas por cultura[83] devem ser classificadas nesta cultura única. Substancialmente, se menos de 1.000 células binucleadas por cultura (para culturas duplicadas) ou se menos de 2.000 (para cultura única) estiverem disponíveis para classificação, em cada concentração, e o aumento significativo em micronúcleos não for detectado, o teste deve ser repetido usando-se mais células ou em concentrações menos citotóxicas – o que for apropriado. Deve-se tomar cuidado para não marcar células binucleadas com formas irregulares ou onde os dois núcleos diferem grandemente em tamanho. Além disso, células binucleadas não devem ser confundidas com células multinucleadas mal distribuídas. Células contendo mais de dois núcleos principais não devem ser analisadas para micronúcleos, uma vez que a frequência do micronúcleo basal pode ser maior nessas células[84]. A classificação de células mononucleadas é aceitável se a substância química em teste interferir com a atividade do citobol. Um teste de repetição sem cytoB pode ser útil em tais casos. A classificação de células mononucleadas, além das células binucleadas, poderia fornecer informações úteis[85-86], mas não é obrigatória.

45. Em linhagens celulares testadas sem tratamento com cytoB, micronúcleos devem ser pontuados em, pelo menos, 2.000 células por concentração de teste e controle[83], divididos igualmente entre as repetições, se réplicas forem utilizadas. Quando são utilizadas culturas únicas por concentração (ver parágrafo 28), pelo menos 2.000 células por cultura devem ser classificadas nesta cultura única. Substancialmente, se menos de 1.000 células por cultura (para culturas duplicadas) ou mais de 2.000 (para cultura única) estiverem disponíveis para pontuação, em cada concentração, e aumento significativo em micronúcleos não for detectado, o teste deve ser repetido usando-se mais células ou em concentrações menos citotóxicas, o que for apropriado.

46. Quando cytoB é usado, um CBPI ou um IR deve ser determinado para avaliar a proliferação celular (ver anexo 2) usando-se, pelo menos, 500 células por cultura. Quando os tratamentos são realizados na ausência de cytoB, é essencial fornecer evidências de que as células em cultura se dividiram, conforme discutido nos parágrafos 24-28.

Proficiência do laboratório

47. Para estabelecer experiência suficiente com o ensaio antes de usá-lo para testes de rotina, o laboratório deve ter realizado uma série de experimentos com subs-

tâncias positivas de referência, agindo através de mecanismos diferentes (pelo menos, um com ativação metabólica e outro sem – além de um experimento agindo através de um mecanismo aneugênico, selecionado a partir das substâncias listadas na tabela 1) e vários controles negativos (incluindo culturas não tratadas e vários solventes/veículo). Essas respostas de controle, positivas e negativas, devem ser consistentes com a literatura. Isto não é aplicável a laboratórios que tenham experiência, ou seja, que tenham uma base de dados históricos disponível, conforme definido nos parágrafos 49 a 52.

48. Uma seleção de substâncias de controle positivo (ver tabela 1) deve ser investigada com tratamentos curtos e longos, na ausência de ativação metabólica, e também com tratamento curto, na presença de ativação metabólica, a fim de demonstrar proficiência para detectar substâncias clastogênicas e aneugênicas, de determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica e de demonstrar a adequação dos procedimentos de pontuação (análise visual microscópica, citometria de fluxo, citometria de varredura a *laser* ou análise de imagens). Uma gama de concentrações das substâncias selecionadas deve ser escolhida, de modo a fornecer aumentos reprodutíveis e relacionados à concentração acima do fundo, a fim de demonstrar a sensibilidade e a faixa dinâmica do sistema de teste.

Dados históricos de controle

49. O laboratório deve estabelecer:

- Um histórico do intervalo de controle positivo e distribuição
- Um histórico do intervalo de controle negativo (não tratado, solvente) e distribuição

50. Ao obter os primeiros dados para a distribuição de controle negativo histórica, os controles negativos concorrentes devem ser consistentes com os dados de controle negativo publicados, quando existirem. À medida que mais dados experimentais são adicionados ao controle de distribuição, os controles negativos concorrentes devem idealmente estar dentro dos limites de controle de 95% dessa distribuição[87-88]. O banco de dados históricos de controle negativo do laboratório deve inicialmente ser construído com o mínimo de 10 experimentos, mas deverá consistir preferencialmente de, pelo menos, 20 experimentos conduzidos sob condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem usar métodos de controle de qualidade, como gráficos de controle (por exemplo, C-charts ou X-bar

charts[88]), para identificar quão variáveis são seus dados de controle positivos e negativos e para mostrar que a metodologia está sob seu controle[83]. Recomendações adicionais sobre como construir e usar os dados históricos (ou seja, critérios para inclusão e exclusão e critérios de aceitabilidade para um dado experimento) podem ser encontradas na literatura[87].

51. Quaisquer mudanças no protocolo experimental devem ser consideradas em termos de consistência de informações no bancos de dados históricos de controle, existentes no laboratório. Quaisquer inconsistências importantes devem resultar no estabelecimento de um novo banco de dados de controle histórico.

52. Os dados de controle negativo devem consistir na incidência de células micronucleadas de uma única cultura ou a soma de culturas replicadas, conforme descrito no parágrafo 28. Controles negativos concorrentes devem, idealmente, estar dentro dos limites de controle de 95% da distribuição base de dados históricos de controle negativo do laboratório[87-88]. Se os dados de controle negativo concorrentes estiverem fora dos limites de controle de 95%, eles podem ser aceitáveis para inclusão na distribuição de controle, desde que esses dados não sejam extremos e existam evidências de que o sistema de teste está 'sob controle' (ver parágrafo 50) e evidências de ausência de falhas técnicas ou humanas.

DADOS E RELATÓRIOS

Apresentação dos resultados

53. Se a técnica de bloqueio de citocinese for utilizada, apenas as frequências de células binucleadas com micronúcleos (independentemente do número de micronúcleos por célula) são utilizadas na avaliação da indução do micronúcleo. A pontuação do número de células com um, dois ou mais micronúcleos pode ser relatada separadamente e pode fornecer informações úteis, mas não é obrigatória.

54. Medidas concomitantes de citotoxicidade e/ou citostase para todas as culturas de controle tratadas, negativas e positivas, devem ser determinadas[16]. O CBPI ou o RI devem ser calculados para todas as culturas tratadas e de controle como medidas do atraso do ciclo celular quando o método de bloqueio de citocinese é usado. Na ausência de cytoB, o RPD ou o RICC deve ser utilizado (ver anexo 2).

55. Os dados individuais da cultura devem ser fornecidos. Além disso, todos os dados devem ser resumidos em forma de tabela.

Critérios de Aceitação

56. A aceitação de um teste baseia-se nos seguintes critérios:

- O controle negativo concorrente é considerado aceitável para inclusão na base de dados de controle negativo histórico laboratorial, conforme descrito no parágrafo 50
- Controles positivos concorrentes (ver parágrafo 50) devem induzir respostas compatíveis com aquelas geradas na base de dados históricos de controle positivo do laboratório e produzir aumento estatisticamente significativo, em comparação com o controle negativo concorrente
- Os critérios de proliferação celular no controle do solvente devem ser cumpridos (parágrafo 25-27)
- Todas as condições experimentais foram testadas, a menos que levassem a resultados positivos (parágrafos 36-40)
- Número adequado de células e concentrações é analisável (parágrafos 28 e 44-46)
- Os critérios para a seleção da concentração máxima são consistentes com aqueles descritos nos parágrafos 24-31

Avaliação e interpretação de resultados

57. Desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância química em estudo é considerada claramente positiva se, em qualquer uma das condições experimentais examinadas (ver parágrafos 36-39):

- Pelo menos, uma das concentrações do ensaio apresentar aumento estatisticamente significativo em comparação com o controle negativo concorrente[89]
- O aumento estiver relacionado com a dose em, pelo menos, uma condição experimental, quando avaliado com um teste de tendência apropriado (ver parágrafo 28)
- Qualquer um dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em Poisson) (ver parágrafo 52)

Quando todos esses critérios são atendidos, a substância química em teste é considerada capaz de induzir quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda neste sistema de teste. Recomendações para os métodos estatísticos mais apropriados também podem ser encontradas na literatura[90-92].

58. Desde que sejam preenchidos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância química em estudo é considerada claramente negativa se, em todas as condições experimentais examinadas (ver parágrafos 36-39):

- Nenhuma das concentrações do teste apresentar aumento estatisticamente significativo em comparação com o controle negativo concorrente
- Não houver aumento relacionado à concentração, quando avaliado com um teste de tendência apropriado
- Todos os resultados estiverem dentro da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em Poisson) (ver parágrafo 52)

O teste químico é considerado incapaz de induzir quebras de cromossomas e/ou ganho ou perda neste sistema de teste. Recomendações para os métodos estatísticos mais apropriados também podem ser encontradas na literatura[90-92].

59. Não há exigência de verificação de uma clara resposta positiva ou negativa.

60. Caso a resposta não seja claramente negativa ou positiva, conforme descrito acima, e/ou para auxiliar no estabelecimento da relevância biológica de um resultado, os dados devem ser avaliados por julgamento de especialistas e/ou investigações adicionais. Pontuar células adicionais (quando apropriado) ou realizar uma experiência repetida, possivelmente usando condições experimentais modificadas (por exemplo, espaçamento de concentração, outras condições de ativação metabólica – isto é, concentração S9 ou origem S9), pode ser útil.

61. Em casos raros, mesmo após investigações posteriores, se o conjunto de dados não permitir uma conclusão positiva ou negativa, o teste será concluído como equivocado ou inconclusivo.

62. As substâncias químicas em teste que induzem micronúcleos no teste MNvit podem fazê-lo porque induzem quebra de cromossomo, perda de cromossomo

ou uma combinação dos dois. Análises posteriores, utilizando anticorpos anticinetocoros, sondas *in situ* específicas do centrômero ou outros métodos, podem ser usadas para determinar se o mecanismo de indução do micronúcleo é devido à atividade clastogênica e/ou aneugênica.

Relatório de teste

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

Substância química de ensaio:

- Fonte, número de lote, data limite para uso, se disponíveis
- Estabilidade da própria substância química em estudo, se conhecida
- Reatividade das substâncias químicas em teste com o solvente/veículo ou meio de cultura celular
- Solubilidade e estabilidade da substância química em estudo no solvente, se conhecido
- Medição do pH, da osmolalidade e do precipitado no meio de cultura ao qual a substância química em teste foi adicionada, conforme apropriado

Substância monoconstituinte:

- Aparência física, solubilidade em água e propriedades físico-químicas relevantes adicionais
- Identificação química, como nome IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, conforme apropriado e praticamente viável, etc.

Substância multiconstituinte, UVBC e misturas:

- Caracterizados, tanto quanto possível, por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes

Solvente:

- Justificativa para escolha do solvente
- Percentagem de solvente no meio de cultura final

Células:

- Tipo e fonte de células utilizadas
- Adequação do tipo de célula utilizada
- Ausência de micoplasma, no caso de linhagens celulares
- Para linhagens celulares, informação sobre o comprimento do ciclo celular ou índice de proliferação
- Onde são utilizados linfócitos, sexo de doadores de sangue, idade e qualquer informação relevante sobre o doador, sangue total ou linfócitos separados, mitógeno utilizado
- Tempo de ciclo celular normal (controle negativo)
- Número de passagens, se disponíveis, para linhagens celulares
- Métodos para a manutenção de culturas celulares, para linhagens celulares
- Número modal de cromossomos, para linhagens celulares

Condições de teste:

- Identidade da substância bloqueadora de citocinese (por exemplo, cytoB), se utilizada, sua concentração e duração da exposição celular
- Concentração da substância química em ensaio expressa como concentração final do meio de cultura (por exemplo, μg ou mg/ml ou mM do meio de cultura)
- Justificativa para a seleção de concentrações e o número de culturas, incluindo dados de citotoxicidade e limitações de solubilidade
- Composição dos meios de comunicação, concentração de CO_2, se aplicável, nível de umidade
- Concentração (e/ou volume) do solvente e substância química em teste adicionados ao meio de cultura; temperatura e tempo de incubação
- Duração do tratamento
- Tempo de coleta após o tratamento
- Densidade celular na sementeira, se aplicável
- Tipo e composição do sistema de ativação metabólica, fonte de S9, método de preparação da mistura S9, concentração ou volume de mistura S9 e S9 no meio de cultura final, controles de qualidade de S9 (por exemplo, atividade enzimática, esterilidade, capacidade metabólica)

- Substâncias de controle positivas e negativas, concentrações finais, condições e durações de períodos de tratamento e recuperação
- Métodos de preparação de lâminas e técnica de coloração utilizada
- Critérios para classificar células micronucleadas (seleção de células analisáveis e identificação de micronúcleo)
- Números de células analisadas
- Métodos para as medições de citotoxicidade
- Qualquer informação suplementar relevante para a citotoxicidade e o método utilizado
- Critérios para considerar os estudos como positivos, negativos ou inconclusivos
- Método(s) de análise estatística utilizado(s)
- Métodos, tais como a utilização de anticorpos cinetocoros ou sondas específicas pancentroméricas, para caracterizar se os micronúcleos contêm cromossomos inteiros ou fragmentados, se aplicável
- Métodos utilizados para determinar pH, osmolalidade e precipitação

Resultados:

- Definição de células aceitáveis para análise
- Na ausência de cytoB, o número de células tratadas e o número de células coletadas para cada cultura, no caso de linhagens celulares
- Medição da citotoxicidade utilizada; por exemplo, método CBPI ou RI, no caso de bloqueio de citocinese; RICC ou RPD, quando não são utilizados métodos de bloqueio de citocinese; outras observações, se houver (por exemplo, confluência celular, apoptose, necrose, contagem de metáfase, frequência de células binucleadas)
- Sinais de precipitação e tempo de determinação
- Dados sobre o pH e a osmolalidade do meio de tratamento, se determinado
- Distribuição de células mono-, bi- e multinucleadas, se for utilizado um método de bloqueio de citocinese
- Número de células com micronúcleos administradas separadamente, para cada cultura tratada e de controle e para distinguir células binucleadas de mononucleadas, quando apropriado

- Relação concentração-resposta, quando possível
- Dados de controle negativo concorrente (solvente) e positivo (concentrações e solventes)
- Histórico negativo (solvente) e controle positivo, com intervalos, médias, desvio padrão e limites de controle de 95% para a distribuição, bem como o número de dados
- Análise estatística; valores de p, se houver

Discussão dos resultados

Conclusões

LITERATURA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, Nº 234, OECD, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test, Mutation Research, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, Mutation Research, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, Cytobios, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000), Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, Nature Protocols, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation, Mutation Research, Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 13/1, pp. 34-43.

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in-situ hybridisation with chromosome-specific DNA probes, Mutation Research, Vol. 234/5, pp. 9-20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993), The use of fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, Mutagenesis, Vol. 8/4, pp. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, Mutation Research, Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, Mutagenesis, Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, Mutation Research, Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996), Fluorescence in situ hybridisation (FISH) with chromosome- specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, Mutation Research, Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, Mutation Research, Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay work-

ing group, Mutation Research, Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) OECD (1997), Test Nº 473: *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264071261-en.

(19) Lorge, E. *et al.* (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. *et al.* (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertini, S. *et al.* (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, Mutation Research, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. *et al.* (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, Mutation Research, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

(26) Miller, B. *et al.* (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, Mutation Research, Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al*. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 439 (2); Feb 19, 1999; pp.183-190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese

hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, Mutation Research, Vol. 445/1, pp. 55-71.

(29) Von der Hude, W. *et al.* (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, Mutation Research, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, Mutation Research, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al.* (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), Mutagenesis, Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010), Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial, Mutation Research, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011), Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol. 59/1, pp. 28-36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011), Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent *versus* p53-deficient human lymphoblastoid cells, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 52/5, pp. 373-384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

(37) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing, ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, Available at: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

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

(39) Corvi, R. *et al*. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), Mutagenesis, Vol 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft), Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. Mutation Research.

(41) Scott, D. *et al*. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Research, Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, Mutation Research, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, Environmental Mutagenesis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(44) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, Mutation Research, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, Environmental and Molecular Mutation., Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, Mutation Research, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, Mutation Research, Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C.M. *et al.* (2010), Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: rel-

evance to genomic instability in colon carcinogenesis, Nutrition and Cancer, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010), Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010), Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays, Mutagenesis, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Josse, R. *et al*. (2012), An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay, Mutagenesis, Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, Mutagenesis, Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, Toxicology, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Gibson, D.P. *et al.* (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, Mutation Research, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 37/1, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Research, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(57) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, Journal of Environmental Pathology and Toxicology, Vol. 4/1, pp. 55-65.

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays, Mutagenesis, Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976), "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta- naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 28, pp. 51-59.

(61) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [http://www.pops.int/]

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, Mutation Research, Vol.190/3, pp. 225-8.

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

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, Environmental Mutagenesis, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(65) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, Mutation Research, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(66) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, Mutation Research, Vol. 285/1, pp. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, Mutation Research, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", Mutation Research, 564, 97-100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(70) Surralles, J. *et al.* (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole- blood and isolated human lymphocyte cultures, Mutation Research, Vol. 341/3, pp. 169-184.

(71) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, Mutation Research, Vol. 724, pp. 86-87.

(72) Pfuhler, S. *et al.* (2011), In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop, Mutation Research, Vol. 723/2, pp. 101-107.

(73) OECD (2014) Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Available upon request.

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, Mutation Research, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012), Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells, Mutation Research, Vol.746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An Application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. Mutat Res. 1983 Jun;120(4), pp. 241-7.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011), Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 52/4, pp. 280-286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011), In vitro micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 52/5, pp. 355-362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010), Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies, Mutagenesis, Vol. 25/1, pp. 33-40.

(83) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, Nº 198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutation Research, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998), Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, Mutagenesis, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011), The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance, Archives of Toxicology, Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al.* (2010), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol.723/2, pp. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003), "*In vitro* micronucleus test', in Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, 2nd ed., Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(92) Richardson, C. et al. (1989), "Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

ANEXO 1

Definições

Aneugeno: qualquer substância ou processo que, ao interagir com os componentes do aparato do ciclo de divisão celular mitótico e meiótico, leva à aneuploidia em células ou organismos.

Aneuploidia: qualquer desvio do número diploide normal (ou haploide) de cromossomos por um único cromossomo ou mais de um, mas não por conjunto(s) completo(s) de cromossomos (poliploidia).

Apoptose: morte celular programada, caracterizada por uma série de etapas que levam à desintegração das células em partículas ligadas à membrana, que são então eliminadas por fagocitose ou por derramamento.

Proliferação celular: o aumento do número de células como resultado da divisão celular mitótica.

Centrômero: a região do DNA de um cromossomo onde ambas as cromátides são mantidas juntas e nas quais ambos os cinetocoros são conectados lado a lado.

Concentrações: referem-se às concentrações finais da substância química em estudo no meio de cultura.

Clastógeno: qualquer substância ou evento que cause aberrações cromossômicas estruturais em populações de células ou organismos eucarióticos.

Citocinese: o processo de divisão celular imediatamente após a mitose para formar duas células filhas, cada uma contendo um único núcleo.

Índice de proliferação de blocos de citocinese (CBPI, em inglês): a proporção de células de segunda divisão na população tratada relativamente ao controle não tratado (ver anexo 2 para a fórmula).

Citostase: inibição do crescimento celular (ver anexo 2 para a fórmula).

Citotoxicidade: para os ensaios cobertos nesta Diretriz, realizados na presença de citocalasina B, a citotoxicidade é identificada como a redução no índice de proliferação de bloqueio de citocinese (CBPI) ou Índice de Replicação (RI) das células tratadas em comparação com o controle negativo (ver parágrafo 26 e anexo 2). Para os ensaios abrangidos nesta Diretriz, realizados na ausência de citocalasina B, a citotoxicidade é identificada como a redução na duplicação relativa da população (RPD) ou no aumento relativo na contagem de células (RICC) das células tratadas em comparação com o controle negativo (ver parágrafo 27 e anexo 2).

Genotóxico: termo genérico que abrange todos os tipos de danos no DNA ou nos cromossomos, incluindo quebras, deleções, adulterações, modificações e ligações de nucleotídeos, rearranjos, mutações gênicas, aberrações cromossômicas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos resultam em mutações ou danos cromossômicos estáveis.

Células na interfase: células que não se encontram no estágio mitótico.

Cinetocoro: uma estrutura contendo proteína que se reúne no centrômero de um cromossomo ao qual as fibras do fuso se associam durante a divisão celular, permitindo o movimento ordenado dos cromossomos filhos para os polos das células filhas.

Micronúcleos: pequenos núcleos, separados e adicionais aos principais núcleos de células, produzidos durante a telófase de mitose ou meiose por fragmentos de cromossomos atrasados ou cromossomos inteiros.

Mitose: divisão do núcleo da célula geralmente dividida em prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Índice mitótico: a proporção de células em metáfase dividida pelo número total de células observadas em uma população de células; uma indicação do grau de proliferação celular dessa população.

Mutagênica: produz uma mudança hereditária de sequências de pares de bases de DNA em genes ou da estrutura de cromossomos (aberrações cromossômicas).

Não disjunção: falha de separar as cromátides pareadas e segregar adequadamente às células filhas em desenvolvimento, resultando em células filhas com número anormal de cromossomos.

Status da p53: a proteína p53 está envolvida na regulação do ciclo celular, da apoptose e do reparo de DNA. Células deficientes em proteína p53 funcional, incapazes de deter o ciclo celular ou de eliminar células danificadas por apoptose ou outros mecanismos (por exemplo, indução de reparo de DNA) relacionadas a funções p53 em resposta a danos no DNA, devem ser teoricamente mais propensas a mutações genéticas ou aberrações cromossômicas.

Poliploidia: aberrações cromossômicas numéricas em células ou organismos envolvendo todo o conjunto de cromossomos, em oposição a um cromossomo individual ou cromossomos (aneuploidia).

Índice de proliferação (IP): método de medição da citotoxicidade quando o citocromo não é utilizado (ver o anexo 2 para a fórmula).

Aumento Relativo na Contagem de Células (RICC, em inglês): método de medição de citotoxicidade quando cytoB não é utilizado (ver anexo 2 para a fórmula).

Duplicação relativa da população (RPD, em inglês): método de medição da citotoxicidade quando o citocromo não é utilizado (ver anexo 2 para a fórmula).

Índice de replicação (IR): a proporção de ciclos de divisão celular completados numa cultura tratada, em relação ao controle não tratado, durante o período de exposição e recuperação (ver anexo 2 para a fórmula).

Fração de fígado S9: sobrenadante de homogenato de fígado após 9.000g de centrifugação, ou seja, extrato de fígado cru. S9 mix: mistura da fração S9 do fígado e cofatores necessários para a atividade metabólica das enzimas.

Controle do solvente: termo geral para definir as culturas de controle que recebem o solvente sozinho utilizado para dissolver a substância química em teste.

Controle não tratado: culturas que não recebem tratamento (i.e.: nenhuma substância química em teste ou solvente), mas são processadas concorrentemente do mesmo modo que as culturas que receberam a substância química em teste.

ANEXO 2

Fórmulas para avaliação da citotoxicidade

1. Quando se utiliza cytoB, a avaliação da citotoxicidade deve basear-se no Índice de Proliferação de Blocos de Citocinases (CBPI) ou no Índice de Replicação (RI)[17;69]. O CBPI indica o número médio de núcleos por célula e pode ser usado para calcular a proliferação celular. O IR indica o número relativo de ciclos celulares por célula durante o período de exposição ao citocromo, em culturas tratadas, em comparação com culturas de controle e pode ser utilizado para calcular a % de Citóstase:

% Citóstase = 100-100 $\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$ e:

T = cultura de tratamento do produto químico

C = cultura de controle

Onde:

$$\textbf{CBPI} = \frac{\begin{array}{c}((\text{N}^{\text{o}}\text{ de Células mononucleares}) + (2\times \text{n}^{\text{o}}\text{ Cél. binucleadas.}) \\ + (3\times\text{cél. multinucleadas}))\end{array}}{(\text{Número total de células})}$$

Assim, um CBPI de 1 (todas as células são mononucleadas) é equivalente a 100% de Citóstase.

Citóstase = 100-RI

$$\textbf{RI} = \frac{\begin{array}{c}((\text{N}^{\text{o}}\text{ Células binucleadas}) + (2 \times \text{N}^{\text{o}}\text{ Cél. multinucleadas})) \div \\ (\text{N}^{\text{o}}\text{ total de cél.})\ \text{T}\end{array}}{\begin{array}{c}((\text{N}^{\text{o}}\text{ células binucleadas}) + \\ (2 \times \text{n}^{\text{o}}\text{ cél. multinucleadas})) \div (\text{N}^{\text{o}}\text{ total de cél})\ \text{C}\end{array}} \times 100$$

T = culturas tratadas

C = culturas de controle

2. Assim, um IR de 53% significa que, comparado com o número de células que se dividiram para formar células binucleadas e multinucleadas na cultura de controle, apenas 53% deste número foi dividido na cultura tratada, isto é, 47% de Citóstase.

3. Quando cytoB não é utilizado, recomenda-se a avaliação da citotoxicidade com base no **aumento relativo das contagens celulares (RICC)** ou na **duplicação relativa da população (RPD)**[69], uma vez que ambos têm em conta a proporção da população celular dividida.

$$\textbf{RICC} = \frac{(\text{Aumento no número de células em culturas tratadas (final - partida)})}{(\text{Aumento no número de células em culturas de controle (final - início)})} \times 100$$

$$\textbf{RPD} = \frac{(\text{N}^{\text{o}}\text{ de duplicações de população em culturas tratadas})}{(\text{N}^{\text{o}}\text{ de duplicações de população em culturas de controle})} \times 100$$

Onde:

Duplicação de População = [log (Número de células pós-tratamento ÷ Número de células iniciais)] ÷ log 2

4. Assim, um RICC, ou um RPD de 53%, indica 47% de citotoxicidade/Citóstase.

5. Utilizando o **Índice de Proliferação (IP)**, a citotoxicidade pode ser avaliada através da contagem do número de clones, consistindo de 1 célula (cl1), 2 células (cl2), 3 a 4 células (cl4) e 5 a 8 células (cl8).

$$\mathbf{PI} = \frac{((1x\ cl1) + (2x\ cl2) + (3x\ cl4) + (4x\ cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. O IP tem sido usado como um valioso e confiável parâmetro de citotoxicidade também para linhagens celulares *in vitro* na ausência de cytoB[35-38] e pode ser visto como um parâmetro adicional útil.

Em qualquer caso, o número de células antes do tratamento deve ser o mesmo para as culturas tratadas e o controle negativo.

Embora o CCR (isto é, o número de células em culturas tratadas/Número de células em culturas de controle) tenha sido utilizado como parâmetro de citotoxicidade no passado, já não é recomendado, pois pode subestimar a citotoxicidade.

Ao usar sistemas de pontuação automatizados, por exemplo, citometria de fluxo, citometria de varredura a *laser* ou análise de imagem, o número de células na fórmula pode ser substituído pelo número de núcleos.

Nas culturas de controle negativo, o dobro da população ou o índice de replicação deve ser compatível com o requisito de amostrar as células após o tratamento, num período equivalente, cerca de 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.

Adotado: 29 de julho de 2016

Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 421

Teste de triagem de reprodução / desenvolvimento de toxicidade

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes OECD para Teste de Substâncias Químicas são periodicamente revistas à luz do progresso científico. A Diretriz 421 foi adotada em 1995, baseada em um protocolo para "Teste de Triagem Preliminar de Toxicidade Reprodutiva", discutido em duas reuniões de peritos, em Londres, em 1990[1] e em Tóquio[2] em 1992.

2. Esta Diretriz foi atualizada com achados relevantes sobre desreguladores endócrinos, como o seguimento à atividade de alta prioridade, iniciada na OECD em 1998, para revisar as Diretrizes e para desenvolver novas guias para triar e testar potenciais desreguladores endócrinos[3]. A Diretriz 407 (Estudo de Toxicidade Oral por Dose Diária Repetida por 28 dias), por exemplo, foi aprimorada em 2008 com parâmetros adequados para detectar a atividade endócrina de substâncias químicas de teste. O objetivo, ao atualizar a Diretriz 421, foi incluir alguns achados relevantes de desreguladores endócrinos nas diretrizes de triagem, de forma que os intervalos de exposição cobrissem alguns dos períodos sensíveis durante o desenvolvimento (pré-natal ou perinatal).

3. Os achados relevantes sobre desreguladores endócrinos, selecionados e adicionados, que fazem parte da Diretriz 443 (Estudo de Toxicidade Reprodutiva Estendido de uma Geração), foram incluídos na Diretriz 421 com base em um estudo de viabilidade, abordando questões técnicas e científicas relacionadas à inclusão daqueles itens, além de possíveis adaptações ao melhor desenho do teste necessário para estas inclusões[4].

4. A Diretriz foi desenhada para gerar informação limitada relativa aos efeitos da substância química de teste no desempenho reprodutivo feminino e masculino, tais como função gonadal, comportamento de acasalamento, concepção, desenvolvimento do concepto e parto. Não é uma alternativa, nem substitui as Diretrizes 414, 415, 416 ou 443.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. A Diretriz de Triagem pode ser usada para fornecer informação inicial sobre possíveis efeitos na reprodução e/ou no desenvolvimento, tanto nos estágios iniciais de avaliação das propriedades toxicológicas das substâncias químicas, quanto sobre as substâncias químicas de interesse.

Também pode ser usada como parte de um conjunto de testes de triagem inicial para substâncias químicas existentes, para as quais pouca ou nenhuma informação toxicológica esteja disponível, como ensaios mais extensos de determinação de faixa de dose para estudos de reprodução/desenvolvimento, ou quando for considerado relevante. Ao conduzir o estudo, devem ser seguidos os princípios e considerações definidos no Documento de Orientação nº 19 da OECD sobre reconhecimento, avaliação e uso de sinais clínicos como parâmetros humanos em avaliações de segurança usando animais de experimentos[5].

6. Este teste não fornece informações completas sobre todos os aspectos da reprodução e do desenvolvimento. Em particular, oferece apenas meios limitados de detecção de manifestações pós-natais de exposição pré-natal ou efeitos que podem ser induzidos durante a exposição pós-natal. Entre outras razões, devido ao número relativamente pequeno de animais nos grupos de dose, à seletividade do desfecho (*endpoints*) e à curta duração do estudo, este método não fornece evidências para reivindicações definitivas de não-efeito. Além disso, na ausência de dados de outros testes de toxicidade de reprodução/desenvolvimento, os resultados positivos são úteis para a avaliação inicial de riscos e contribuem para decisões com relação à necessidade e ao momento de testes adicionais.

7. Os resultados obtidos, relacionados aos parâmetros endócrinos, devem ser vistos no contexto da "Estrutura Conceitual da OECD para Testes e Avaliação de Substâncias Químicas de Desregulação Endócrina"[6]. Nesta Estrutura Conceitual, a Diretriz 421 aprimorada está contida no nível 4 como um ensaio *in vivo*, fornecendo dados sobre efeitos adversos em desfechos endócrinos relevantes. No entanto, um sinal endócrino pode não ser considerado prova suficiente de que a substância química em teste seja um desregulador endócrino.

8. Esta Diretriz pressupõe a administração oral da substância química em teste. Modificações podem ser necessárias se outras vias de administração forem usadas.

9. Antes de aplicar a Diretriz de Teste em uma mistura para gerar dados para uma finalidade regulatória pretendida, deve-se considerar se e por que a diretriz pode fornecer resultados adequados para essa finalidade. Tais considerações não são necessárias quando há uma exigência regulamentar para o teste da mistura.

10. As definições usadas estão no anexo 1.

PRINCÍPIOS DO TESTE

11. A substância química de teste é administrada em doses graduadas a vários grupos de machos e fêmeas.

Os machos devem ser testados por, no mínimo, quatro semanas e até o dia anterior ao sacrifício programado (mínimo de duas semanas antes do acasalamento, durante o período de acasalamento e, aproximadamente, duas semanas após o acasalamento). Tendo em conta o período curto de tratamento pré-acasalamento em machos, a fertilidade pode não ser um indicador específico sensível da toxicidade testicular. Portanto, um exame histológico detalhado dos testículos é essencial. A combinação de um período de dosagem pré-acasalamento de duas semanas e subsequentes observações de acasalamento/fertilidade com um período de dosagem global de, pelo menos, quatro semanas, seguida de histopatologia detalhada das gônadas masculinas, é considerada suficiente para permitir a detecção da maioria dos efeitos sobre fertilidade masculina e espermatogênese.

12. As fêmeas devem ser testadas durante todo o estudo. Isso inclui duas semanas antes do acasalamento (com o objetivo de cobrir, pelo menos, dois cios completos), o tempo variável até a concepção, a duração da gestação e, no mínimo, treze dias após o parto, até, inclusive, o dia anterior ao sacrifício programada.

13. A duração do estudo, após a aclimatação e a avaliação do cio pré-dosagem, depende do desempenho da fêmea e é de aproximadamente 63 dias [no mínimo, 14 dias antes do acasalamento (até) 14 dias de acasalamento, 22 dias de gestação, 13 dias de lactação].

14. Durante o período de administração, os animais são observados de perto a cada dia quanto a sinais de toxicidade. Os animais que morrem ou são eutana-

siados durante o período de teste são necropsiados e, na conclusão do teste, os animais sobreviventes são eutanasiados e necropsiados.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção da espécie animal

15. Esta Diretriz foi projetada para uso em ratos. Se os parâmetros especificados dentro da Diretriz 421 forem investigados em outra espécie de roedor, uma justificativa detalhada deve ser dada. No programa internacional de validação para a detecção de desreguladores endócrinos na Diretriz 407, o rato foi a única espécie utilizada. Cepas com baixa fecundidade ou com alta incidência bem conhecida de defeitos de desenvolvimento não devem ser usadas. Devem ser usados animais virgens, saudáveis e não submetidos a procedimentos experimentais anteriores. Os animais de teste devem ser caracterizados quanto a: espécie, linhagem, sexo, peso e idade.

No início do estudo, a variação de peso dos animais utilizados deve ser mínima e não deve exceder 20% do peso médio de cada sexo. Quando o estudo é conduzido como um estudo preliminar para um ensaio de longo prazo ou de geração completa, é preferível que animais das mesmas linhagem e fonte sejam usados em ambos os estudos.

Alojamento e alimentação

16. Todos os procedimentos devem estar em conformidade com os padrões locais de cuidados com animais de laboratório. A temperatura na sala do animal experimental deve estar em 22°C (±3°). Embora a umidade relativa deva ser de, pelo menos, 30% e não exceder 70% (de preferência), exceto durante a limpeza da sala, o objetivo deve ser mantê-la entre 50 e 60%. A iluminação deve ser artificial, períodos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Para alimentação, as dietas convencionais de laboratório podem ser usadas, com suprimento ilimitado de água potável. A escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de assegurar a mistura adequada de substância química em teste quando administrada por este método.

17. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo; podendo ser alojados individualmente, se houver justificativa metodológica. Para o alojamento em grupo, não mais do que cinco animais devem ser alojados por

caixa. Procedimentos de acasalamento devem ser realizados em caixas adequadas para o propósito. As fêmeas prenhas devem ser mantidas individualmente em caixas e providas de materiais de nidificação. Fêmeas lactantes serão mantidas individualmente em caixas com sua cria.

18. A alimentação deve ser analisada regularmente quanto a contaminantes. Uma amostra da dieta deve ser mantida até a finalização do relatório.

Preparação dos animais

19. Animais adultos jovens e saudáveis são aleatoriamente selecionados para os grupos de controle e tratamento. As caixas devem ser organizadas de tal forma que os possíveis efeitos do posicionamento da caixa sejam minimizados. Os animais são identificados e mantidos em suas caixas por, pelo menos, cinco dias antes do início do estudo para permitir a aclimatação às condições laboratoriais.

Preparação das doses

20. Recomenda-se que a substância química em estudo seja administrada por via oral, a menos que outras vias de administração sejam consideradas mais apropriadas.

Quando a via oral é selecionada, a substância química de teste é geralmente administrada por sonda estomacal; no entanto, alternativamente, as substâncias químicas de teste podem ser administradas através de dieta ou água potável.

21. Quando necessário, a substância química em estudo é dissolvida ou é preparada uma suspensão em um veículo adequado. Recomenda-se, sempre que possível, escolher uma solução/suspensão aquosa em primeiro lugar, seguida da consideração de uma solução/emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho) e, por fim, uma solução em outros veículos. Para outros veículos, que não a água, as características tóxicas do veículo devem ser conhecidas. A estabilidade e a homogeneidade da substância química em teste no veículo devem ser determinadas.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

22. Recomenda-se que cada grupo seja iniciado com, no mínimo, 10 machos e

12-13 fêmeas. As fêmeas serão avaliadas pré-exposição para a ciclagem do cio; os animais que não apresentarem ciclos típicos de 4-5 dias não serão incluídos no estudo; portanto, fêmeas extras são recomendadas para garantir 10 fêmeas por grupo. Exceto no caso de efeitos tóxicos marcantes, espera-se que essa recomendação garanta, pelo menos, 8 fêmeas prenhas por grupo – número mínimo normalmente aceitável de fêmeas prenhas por grupo. O objetivo é produzir gestações e descendentes suficientes para assegurar a avaliação significativa do potencial da substância química em estudo, para afetar a fertilidade, a gestação, o comportamento materno e de amamentação e o crescimento e desenvolvimento da descendência F1 desde a concepção até o 13º dia pós-parto.

Dosagem

23. Pelo menos, três grupos de teste e um grupo de controle devem ser usados. Os níveis de dose podem basear-se em informações de testes de toxicidade aguda ou em resultados de estudos de doses repetidas. Exceto para o tratamento com a substância química em teste, os animais do grupo controle devem ser manipulados de maneira idêntica aos participantes do grupo teste. Se um veículo é usado na administração da substância química em teste, o grupo controle deve receber o veículo no maior volume usado.

24. Os níveis de dose devem ser selecionados levando-se em conta qualquer toxicidade existente e dados cinéticos (e toxicocinéticos) disponíveis. Também deve ser levado em conta que pode haver diferenças na sensibilidade entre fêmeas prenhas e não prenhas.

O maior nível de dose deve ser escolhido, com o objetivo de induzir efeitos tóxicos, mas não morte ou sofrimento grave. Posteriormente, uma sequência descendente de níveis de dose deve ser selecionada, com vista a demonstrar qualquer resposta relacionada com a dosagem e sem observação de efeitos adversos (do inglês: *no observed adverse effects* – NOAEL) ao nível de dose mais baixo. Intervalos de duas a quatro vezes são frequentemente ótimos para estabelecer os níveis de dose descendente. A adição de um quarto grupo de teste é frequentemente preferível ao uso de intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 10) entre as dosagens.

25. Na presença de toxicidade geral observada (redução do peso corporal, efeito hepático, cardíaco, pulmonar ou nos rins, etc.) ou outras alterações que possam

não ser respostas tóxicas (redução da ingestão de alimentos, aumento do volume hepático), efeitos endócrinos sensíveis observados no desfecho devem ser interpretados com cautela.

Teste de limite

26. Pode não ser necessário realizar um estudo completo usando vários níveis de dose, se: (a) for um estudo via oral a nível de dose de, pelo menos, 1.000mg/kg de peso corporal/dia; (b) na administração de água ou de dieta, uma percentagem equivalente na dieta ou água potável, utilizando os procedimentos descritos para este estudo, não produzir efeitos tóxicos observáveis; e (c) não se espera toxicidade com base em dados de substâncias estruturalmente relacionadas. O teste de limite é aplicado, a não ser que a exposição humana indique a necessidade de um nível de dose oral mais alto a ser usado. Para outros tipos de administração, tais como inalação ou aplicação dérmica, as propriedades físico-químicas das substâncias de teste frequentemente podem ditar a concentração máxima atingível.

Administração das doses

27. Os animais são testados com a substância química de teste diariamente durante 7 dias por semana. Quando a substância química em estudo é administrada por sonda esofágica, isto deve ser feito em dose única, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de uma só vez depende do tamanho do animal de teste. O volume não deve exceder 1ml/100g de peso corporal, exceto no caso de soluções aquosas, nas quais podem ser utilizados 2ml/100g de massa corporal.

Para substâncias químicas irritantes ou corrosivas, que normalmente revelam efeitos exacerbados com concentrações mais altas, a variabilidade no volume do teste deve ser minimizada, ajustando a concentração para garantir o volume constante em todos os níveis de dosagem.

28. Para o teste químico administrado através de dieta ou água potável, é importante assegurar que as quantidades da substância química em teste envolvidas não interfiram na nutrição normal ou no equilíbrio hídrico. Quando a substância química em estudo é administrada na dieta, pode utilizar-se uma concentração

alimentar constante (ppm) ou um nível de dose constante em termos do peso corporal dos animais; a alternativa usada deve ser especificada. Para teste químico administrado por sonda estomacal, a dose deve ser administrada em horários semelhantes todos os dias e ajustada, pelo menos, semanalmente, para manter um nível de dose constante em termos de peso corporal do animal.

Cronograma Experimental

29. A dosagem de ambos os sexos deve começar, no mínimo, 2 semanas antes do acasalamento, depois de os animais terem sido aclimatados por, pelo menos, cinco dias e de as fêmeas terem sido rastreadas para ciclos de cio normais (em um período de 2 semanas pré-tratamento). O estudo deve ser programado de tal forma que a avaliação do cio comece logo após os animais terem atingido a maturidade sexual completa. Isto pode variar ligeiramente para diferentes estirpes de ratos em diferentes laboratórios; por exemplo, ratos Sprague Dawley, com 10 semanas de idade, ou ratos Wistar, com cerca de 12 semanas de idade. Fêmeas com filhotes devem ser sacrificadas no 13º dia pós-parto ou logo depois. O dia do nascimento (ou seja, quando o parto está completo) é definido como dia 0 pós-parto. As fêmeas que não apresentam evidência de cópula são sacrificadas 24 a 26 dias após o último dia do período de acasalamento. A dosagem é continuada em ambos os sexos durante o período de acasalamento. Os machos devem ser tratados após o período de acasalamento, pelo menos, até que o período de dosagem total mínimo de 28 dias tenha sido completado. Eles são eutanasiados ou, alternativamente, são retidos e continua sendo dosados para a possível condução de um segundo acasalamento, se considerado apropriado.

30. A dosagem diária das fêmeas prenhas deve continuar durante a gestação e, pelo menos, até, inclusive, o 13º dia pós-parto ou no dia anterior à eutanásia. Para estudos em que a substância química em teste é administrada por inalação ou por via cutânea, a administração deve ser continuada pelo menos até o 19º dia de gestação e a administração deve ser reiniciada o mais rapidamente possível e não depois do PND 4.

31. Um diagrama do cronograma experimental é fornecido no anexo 2.

Procedimento de acasalamento

32. Normalmente, devem ser usados acasalamentos 1:1 (um macho para uma

fêmea) neste estudo. Exceções podem surgir no caso de mortes ocasionais de machos. A fêmea deve ser colocada com o mesmo macho até que se observe evidência de cópula ou tenham decorrido duas semanas. Todas as manhãs, as fêmeas devem ser examinadas quanto à presença de espermatozoides ou de um tampão vaginal. O dia 0 da gestação é definido como o dia em que as provas de acasalamento são confirmadas (um tampão vaginal ou espermatozoide é encontrado). Caso o pareamento não seja bem-sucedido, pode-se considerar o reacasalamento de fêmeas com machos desde que do mesmo grupo.

Tamanho da ninhada

33. No 4º dia após o nascimento, o tamanho de cada ninhada pode ser ajustado, eliminando os filhotes extras por seleção aleatória para produzir, o máximo possível, quatro ou cinco filhotes por sexo por ninhada, dependendo do tamanho normal da ninhada na linhagem de ratos usada. Amostras de sangue devem ser coletadas de dois filhotes excedentes, agrupadas e usadas para determinação dos níveis séricos de T4. A eliminação seletiva de filhotes, com base no peso corporal ou na distância anogenital (AGD, em inglês) não é apropriada. Se o número de filhotes machos ou fêmeas não permitir ter quatro ou cinco de cada sexo por ninhada, um ajuste parcial (por exemplo, seis machos e quatro fêmeas) é aceitável. Nenhum filhote será descartado quando o tamanho da ninhada cair abaixo do alvo de descarte (8 ou 10 filhotes/ninhada). Se houver apenas um filhote disponível acima do alvo de descarte, apenas um filhote será descartado e usado para coleta de sangue para possíveis avaliações de T4 sérico.

34. Se o tamanho da ninhada não for ajustado, dois filhotes por ninhada são eutanasiados no 4º dia após o nascimento e amostras de sangue são coletadas para a medição das concentrações séricas de hormônios tireoidianos. Se possível, os dois filhotes por ninhada devem ser fêmeas, para preservar os filhotes machos para avaliações de retenção de mamilos, a não ser que a remoção desses filhotes não deixe nenhuma fêmea restante para avaliação na terminação do estudo. Nenhum filhote será descartado quando o tamanho da ninhada ficar abaixo de 8 ou 10 filhotes/ninhada (dependendo do tamanho normal da ninhada na linhagem de ratos usada). Se houver apenas um filhote disponível acima do tamanho normal da ninhada, apenas um filhote será descartado e usado para coleta de sangue para possíveis avaliações de T4 sérica.

Nas observações em vida

Observações clínicas

35. Durante todo o período do teste, observações clínicas gerais devem ser feitas pelo menos uma vez por dia e, mais frequentemente, quando são observados sinais de toxicidade. Devem ser feitos preferencialmente ao mesmo tempo, todos os dias, considerando o período de pico dos efeitos previsto após a dosagem. Alterações comportamentais pertinentes, sinais de partos difíceis ou prolongados e todos os sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, devem ser registrados. Esses registros devem incluir o tempo de início, o grau e a duração dos sinais de toxicidade.

Peso corporal e consumo de alimentos e água

36. Machos e fêmeas devem ser pesados no primeiro dia do ensaio, pelo menos uma vez por semana, e no término do estudo. Durante a gestação, as fêmeas devem ser pesadas nos dias 0, 7, 14 e 20 e no período de 24 horas após o parto (dia 0 ou 1 pós-parto) e, pelo menos, nos dias 4 e 13 após o parto. Essas observações devem ser relatadas individualmente por animal adulto.

37. Durante o período de pré-acasalamento, gestação e amamentação, o consumo de alimentos deve ser medido, pelo menos, semanalmente. A medição do consumo de alimentos durante o acasalamento é opcional. O consumo de água durante esses períodos também deve ser medido quando a substância química em teste é administrada via água potável.

Ciclos de cio

38. Os cios devem ser monitorados antes de o tratamento começar, para selecionar as fêmeas com ciclicidade regular (ver parágrafo 22). Esfregaços vaginais também devem ser monitorados diariamente, desde o início do período de tratamento até a evidência de acasalamento. Se houver preocupação com os efeitos do estresse agudo que possam alterar os cios pelo início do ensaio, os laboratórios podem expor os animais durante 2 semanas e coletar esfregaços vaginais diariamente para monitorar o ciclo durante, no mínimo, duas semanas no período de pré-acasalamento – com monitoramento contínuo, no período de acasalamento, até que haja evidência de cópula. Ao obter células vaginais/cervicais, deve-se ter cuidado para evitar distúrbios da mucosa, o que poderia induzir a pseudogestação[7-8].

Parâmetros da ninhada

39. A duração da gestação deve ser registrada, sendo calculada a partir do dia 0 da gestação. Cada ninhada deve ser examinada o mais cedo possível após o parto, para estabelecer o número e o sexo de filhotes, natimortos, nascidos vivos, nanicos (filhotes que são significativamente menores do que os filhotes de controle correspondentes) e a presença de anormalidades grosseiras.

40. Os filhotes vivos devem ser contados, e ter o sexo definido, e as ninhadas devem ser pesadas dentro de 24 horas do parto (dia 0 ou 1 pós-parto) e, no mínimo, nos dias 4 e 13 após o parto. Além das observações descritas no parágrafo 35, qualquer comportamento anormal da progênie deve ser registrado.

41. O AGD de cada filhote deve ser medido no mesmo dia pós-parto entre o PND 0 e o PND 4. O peso corporal do filhote deve ser coletado no dia em que o AGD é medido e o AGD deve ser normalizado para uma medida do tamanho do filhote, raiz cúbica do peso corporal[9]. O número de mamilos/aréolas em filhotes machos deve ser contado no PND 12 ou 13, conforme recomendado na Diretriz 151[10].

Bioquímica clínica

42. As amostras de sangue de um local definido são tomadas com base no seguinte cronograma:

- De, pelo menos, dois filhotes por ninhada no 4º dia após o nascimento, se o número de filhotes permitir (ver parágrafos 33-34);
- De todas as mães e, pelo menos, de dois filhotes por ninhada ao término do dia 13; e
- De todos os machos adultos, no término.

Todas as amostras de sangue são armazenadas sob condições apropriadas. Amostras de sangue de filhotes e machos adultos, do dia 13, são avaliadas quanto aos níveis séricos de hormônios tireoidianos (T4). Uma avaliação adicional de T4 em amostras de sangue de mães e filhotes no dia 4 é feita, se relevante. Como opção, outros hormônios podem ser medidos, se apropriado. Sangue dos filhotes pode ser agrupado por ninhada para análises de hormônios tireoidianos. Os hormônios tireoidianos (T4 e TSH) devem preferencialmente ser medidos como “total”.

43. Os seguintes fatores podem influenciar a variabilidade e as concentrações

absolutas das determinações hormonais:

- Tempo de eutanásia, por causa da variação diurna das concentrações hormonais;
- Método de eutanásia, para evitar estresse indevido para os animais – o que pode afetar as concentrações hormonais;
- Os kits de teste de concentrações hormonais, que podem diferir em suas curvas padrão.

44. Amostras de plasma especificamente destinadas à determinação de hormônios devem ser obtidas em hora comparável do dia. Os valores numéricos obtidos, ao analisar as concentrações hormonais, diferem com vários kits de ensaio comercial.

Patologia

Necropsia macroscópica

45. No momento da eutanásia ou da morte durante o estudo, os animais adultos devem ser examinados macroscopicamente para quaisquer anormalidades ou alterações patológicas. Atenção especial deve ser dada aos órgãos do sistema reprodutivo. O número de locais de implantação deve ser registrado. Esfregaços vaginais devem ser examinados pela manhã do dia da necropsia para determinar o estágio do ciclo de cio e permitir a correlação com a histopatologia dos ovários.

46. Os testículos e epidídimos, assim como as próstatas e vesículas seminais, com glândulas coagulantes como um todo, de todos os animais adultos do sexo masculino, devem ser separados de qualquer tecido aderente, conforme apropriado, e seu peso úmido deve ser coletado o mais rápido possível, após a dissecção, para evitar a secagem. Além disso, os pesos opcionais de órgãos podem incluir o músculo levantador do ânus e o complexo do músculo bulbocavernoso, as glândulas de Cowper, a glande peniana, nos machos, e os ovários emparelhados (peso úmido) e o útero (incluindo o colo do útero), nas fêmeas; se incluídos, esses pesos devem ser coletados o mais rapidamente possível após a dissecação.

47. Filhotes eutanasiados e filhotes mortos no dia 13 pós-parto, ou logo depois, devem ser cuidadosamente examinados externamente em busca de anormalidades grosseiras. Deve-se dar atenção especial aos genitais reprodutivos externos,

que serão examinados em busca de sinais de desenvolvimento alterado. No dia 13, a tireoide de 1 macho e 1 filhote fêmea por ninhada deve ser preservada.

48. Os ovários, os testículos, os órgãos sexuais acessórios (útero e colo do útero, epidídimos, próstata, vesículas seminais e glândulas coagulantes), a tiroide e todos os órgãos que apresentem lesões macroscópicas de todos os animais adultos devem ser preservados. A fixação de formalina não é recomendada para exames de rotina de testículos e epidídimos. Um método aceitável é o uso do fixador de Bouin ou de Davidsons modificado para esses tecidos[11]. A túnica albugínea pode ser perfurada suave e superficialmente, nos dois polos do órgão, com uma agulha para permitir a rápida penetração do fixador.

Histopatologia

49. Para os animais do grupo de dose mais alta e do grupo controle, devem ser realizados exames histológicos detalhados nos ovários, nos testículos e nos epidídimos (com ênfase especial nos estágios de espermatogênese e histopatologia da estrutura das células testiculares intersticiais). Outros órgãos preservados, incluindo a tireoide de filhotes e animais adultos, podem ser examinados quando necessário. O peso da tireoide pode ser determinado após a fixação. O corte também deve ser feito com muito cuidado e somente após a fixação para evitar danos aos tecidos. O dano tecidual pode comprometer a análise histopatológica. Os exames devem ser estendidos aos animais de outros grupos de dosagem quando as mudanças são vistas no grupo de dose mais alta. A orientação sobre histopatologia[11] detalha informações extras sobre dissecção, fixação, seccionamento e histopatologia dos tecidos endócrinos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

50. Devem ser fornecidos dados individuais sobre os animais. Além disso, todos os dados devem ser resumidos em forma de tabela, mostrando, para cada grupo de teste: o número de animais no início do teste; o número de animais encontrados mortos durante o teste ou mortos por eutanásia; o tempo de qualquer tipo de morte; o número de animais férteis; o número de fêmeas prenhes; o número de animais que apresentam sinais de toxicidade; a descrição dos sinais de toxicidade observados, incluindo o tempo de início, duração e gravidade de quaisquer efeitos tóxicos; os tipos de alterações histopatológicas; e todos os dados

relevantes da ninhada. Um modelo de relatório, em formato de tabela resumida, que provou ser muito útil para a avaliação do efeito reprodutivo/desenvolvimento, é fornecido no anexo 3.

51. Devido às dimensões limitadas do estudo, as análises estatísticas na forma de testes para "significância" são de valor limitado para muitos desfechos, especialmente os reprodutivos. Se forem utilizadas análises estatísticas, o método escolhido deve ser apropriado para a distribuição da variável examinada e ser selecionado antes do início do estudo. A análise estatística da retenção de AGD e de mamilos deve ser baseada em dados individuais dos filhotes, levando-se em conta os efeitos da ninhada. Quando apropriado, a ninhada é a unidade de análise. A análise estatística do peso corporal dos filhotes deve ser baseada em dados individuais, levando em consideração o tamanho da ninhada. No caso de grupos pequenos, o uso de dados históricos de controle (por exemplo, para o tamanho da ninhada), quando disponíveis, também pode ser útil na interpretação do estudo.

Avaliação de resultados

52. Os resultados do estudo de toxicidade devem ser avaliados em termos de efeitos observados, necropsia e achados microscópicos. A avaliação incluirá a relação entre a dose da substância química de teste e a presença ou a ausência de anormalidades, sua incidência e gravidade, incluindo lesões macroscópicas, órgãos-alvos identificados, infertilidade, anomalias clínicas, efeitos no desempenho reprodutivo e de ninhada, alterações no peso corporal, na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos.

53. Devido ao curto período de tratamento do macho, a histopatologia dos testículos e epidídimos deve ser considerada juntamente com os dados de fertilidade, quando se avaliam os efeitos reprodutivos masculinos. A utilização de dados históricos de controle sobre reprodução/desenvolvimento (para tamanho de ninhada, AGD, retenção de mamilos, níveis séricos de T4), quando disponível, também pode ser útil na interpretação do estudo.

54. Para controle de qualidade, propõe-se que os dados históricos de controle sejam coletados e que se calculem os coeficientes de variação dos dados, especialmente para os parâmetros ligados à detecção do desregulador endócrino. Esses dados podem ser usados para fins de comparação quando estudos reais são avaliados.

Relatório de teste

55. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

Teste químico:

- Fonte, número do lote, data limite de utilização, se disponível;
- Estabilidade da substância química em estudo, se conhecida.

o Substância monoconstituinte:

  - Aparência física, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas;
  - Identificação química, nome IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI; fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se factível e viável, etc.

o Substância multiconstituinte, UVBCs e misturas:

  - Caracterizado, tanto quanto possível, por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes.

Veículo (se apropriado):

- Justificativa para a escolha do veículo, se não for água.

Animais de Teste:

- Espécie/linhagem utilizada;
- Número, idade e sexo dos animais;
- Fonte, condições de alojamento, dieta, etc;
- Pesos individuais dos animais no início do teste;
- Justificativa para espécies, se não for de rato.

Condições de teste:

- Lógica para seleção do nível de dose;
- Detalhes da formulação química do teste/da preparação da dieta, concentrações atingidas, estabilidade e homogeneidade da preparação;
- Detalhes da administração da substância química em estudo;
- Conversão da concentração química (ppm) do teste de dieta/água potável para a dose real (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;
- Detalhes da qualidade dos alimentos e da água;

- Descrição detalhada do procedimento de randomização para selecionar os filhotes para descarte, se o forem.

Resultados:

- Alterações no peso corporal;
- Consumo de alimentos e de água, se disponível;
- Dados de resposta tóxica por sexo e dose, incluindo fertilidade, gestação e quaisquer outros sinais de toxicidade;
- Duração da gestação;
- Efeitos tóxicos ou outros efeitos na reprodução, na descendência, no crescimento pós-natal, etc;
- Natureza, gravidade e duração das observações clínicas (reversíveis ou não):
  - Número de fêmeas adultas com ciclo de cio normal e anormal e duração do ciclo.
- Número de nascidos vivos e perda pós-implante:
  - Dados do peso corporal dos filhotes.
- AGD de todos os filhotes (e peso corporal no dia da medição AGD);
- Retenção de mamilo em filhotes machos;
- Níveis hormonais da tiroide em filhotes e machos adultos no dia 13 (e mães e filhotes de 4 dias, se for medido);
- Número de filhotes com anormalidades visíveis, avaliação superficial da genitália externa, número de nanicos;
- Hora da morte durante o estudo ou se os animais sobreviveram ao término;
- Número de fecundações, tamanho e peso da ninhada no momento do registro;
- Peso corporal no sacrifício e dados de peso dos órgãos para os animais parentais;
- Achados de necropsia;
- Descrição detalhada dos achados histopatológicos;
- Dados de absorção (se disponíveis);
- Tratamento estatístico dos resultados, quando apropriado.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

Interpretação de resultados

56. O estudo fornecerá avaliações da toxicidade reprodutiva/de desenvolvimento associada à administração de doses repetidas (ver parágrafos 5 e 6). Pode fornecer uma indicação da necessidade de conduzir investigações adicionais e fornecer orientação no desenho de estudos subsequentes. A Diretriz 43 deve ser consultada para auxiliar na interpretação de resultados de reprodução e desenvolvimento[12]. A Diretriz 106, sobre Avaliação Histológica de Testes Endócrinos e Reprodutivos em Roedores[11], fornece informações sobre a preparação e avaliação de órgãos (endócrinos) e esfregaços vaginais que podem ser úteis para esta Diretriz.

LITERATURA

1) OECD (1990). Room Document No. 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.
2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No. 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007).

The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ANEXO 1

DEFINIÇÕES (ver também[6] DT 150)

Androgenicidade: é a capacidade de uma substância química agir como um hormônio androgênico natural (por exemplo, testosterona) em um mamífero.

Antiandrogenicidade: é a capacidade de uma substância química suprimir a ação de um hormônio androgênico natural (como testosterona) em um mamífero.

Antioestrogenicidade: é a capacidade de uma substância química suprimir a ação de um hormônio estrogênico natural (como, estradiol 17ß) em um mamífero.

Atividade antitiroidiana: é a capacidade de uma substância química suprimir a ação de um hormônio natural da tiroide (como Ex.T3) em um mamífero.

Toxicidade no desenvolvimento: a manifestação de toxicidade reprodutiva, representando pré e pós-natal, desordens estruturais ou funcionais na progênie.

Dosagem: é um termo geral que compreende a dose, a sua frequência e a duração do ensaio.

Dose: é a quantidade de substância química de teste administrada. A dose é expressa como peso do teste químico por unidade do peso corporal do animal de teste por dia (por exemplo, mg/kg de peso corporal/dia) ou como uma concentração dietética constante.

Toxicidade evidente: é um termo geral que descreve sinais claros de toxicidade após a administração da substância química em teste. Estes sinais devem ser suficientes para a avaliação dos riscos e serem tais que o aumento na dose administrada possa resultar no desenvolvimento de sinais tóxicos severos e provável mortalidade.

Comprometimento da fertilidade: representa distúrbios de funções e capacidades reprodutivas masculinas ou femininas.

Toxicidade materna: efeitos adversos em fêmeas prenhas, ocorrendo especificamente (efeito direto) ou não especificamente (efeito indireto).

NOAEL: é a abreviatura (do inglês) de nível de efeito adverso não observado. Este é o nível de dose mais alto no qual não se observam achados adversos relacionados ao tratamento.

Estrogenicidade: é a capacidade de uma substância química agir como um hormônio estrogênico natural (por exemplo, estradiol 17ß) em um mamífero.

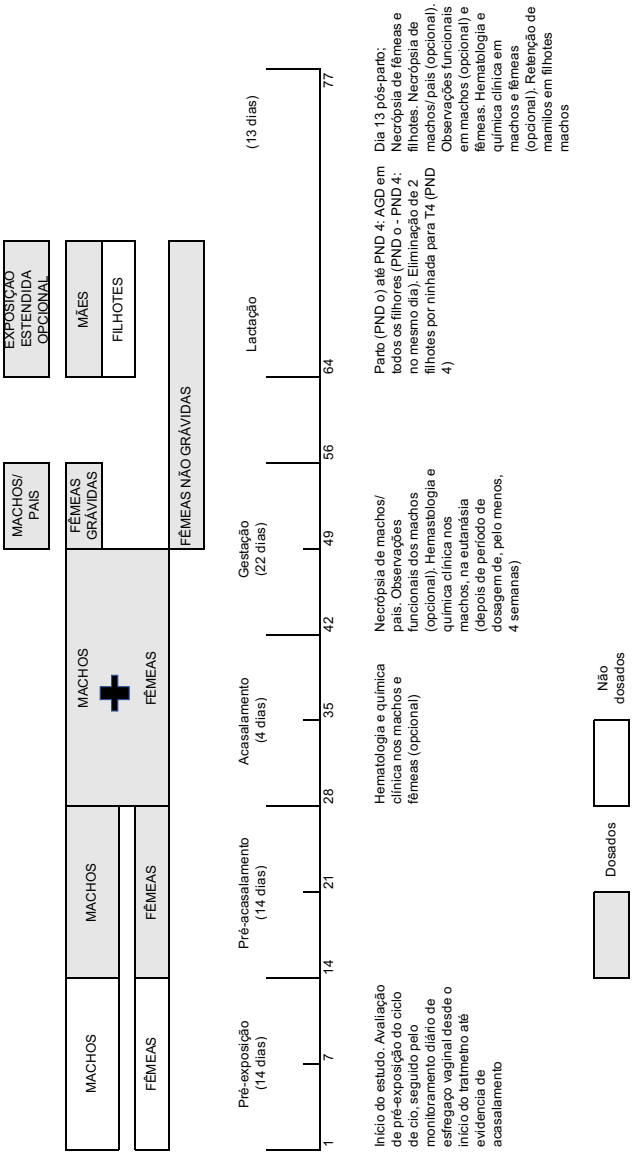
Toxicidade reprodutiva: representa os efeitos nocivos sobre a progênie e/ou o comprometimento ou a incapacidade de funções reprodutivas em machos e fêmeas.

Atividade da tireoide: é a capacidade de uma substância química agir como um hormônio tireoidiano natural (por exemplo, T3) em um mamífero.

Validação: é um processo científico destinado a caracterizar os requisitos e as limitações operacionais de um método de teste e demonstrar sua confiabilidade e relevância para uma finalidade específica.

ANEXO 2

Diagrama do cronograma experimental indicando a duração máxima do estudo, baseado em um período de acasalamento completo de 14 dias



OBSERVAÇÕES	**VALORES**				
Dosagem (unidades) …	o (controle)	***	***	***	***
Pares no início (N)					
Ciclo de cio (pelo menos, duração média e frequência de ciclos irregulares)					
Fêmeas mostrando evidência de cópula (N)					
Fêmeas atingindo gravidez (N)					
Dias de concepção 1 - 5 (N)					
Dias de concepção 6 -. . (12) (N)					
Gravidez< 21 dias (N)					
Gravidez = 22 dias (N)					
Gravidez > 23 dias (N)					
Mães com jovens nascidos vivos (N)					
Mães com jovens vivos no dia 4 pp (N)					
Implantes / mães (média)					
Filhotes vivos / mãe ao nascer (média)					
Filhotes vivos / mãe no dia 4 (média)					
Taxa de sexo no nascimento (média)					
Taxa de sexo no dia 4 (média)					
Peso da ninhada ao nascer (média)					
Peso da ninhada no dia 4 (média)					
Peso do filhote ao nascer (média)					
Peso do filhote no momento da medição da AGD (média dos machos, média das fêmeas)					
AGD do filhote no mesmo dia pós-natal, dia de nascimento 4 (machos médios, fêmeas médias, nota PND)					
Peso do filhote no dia 4 (média)					
Peso do filhote no dia 13 (média)					
Retenção mamilar do filhote macho no dia 13 (média)					
FILHOTES ANORMAIS					
Mães com 0					
Mães com 1					
Mães com > 2					

OBSERVAÇÕES	**VALORES**				
PERDA DE CRIA					
Pré-natal (implantes menos nascimentos vivos)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com > 3					
Pós-natal (nascidos vivos menos vivos no dia 13 pós-natal)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com > 3					
(1) Último dia do período de acasalamento					

Adotado: 29 de julho de 2016

Diretriz da OECD para teste de substâncias químicas - 422

Estudo combinado de toxicidade de dose repetida com o teste de triagem para reprodução/ toxicidade no desenvolvimento

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OECD para o Teste de Substâncias Químicas são revisadas periodicamente à luz do progresso científico. A triagem original da Diretriz de Teste 422 foi adotada em 1996, com base no protocolo para um "Teste combinado de dose repetida e triagem reprodutiva/ de desenvolvimento, discutido em duas reuniões de especialistas, em Londres em 1990[1] e em Tóquio em 1992[2].

2. Combina uma parte de triagem da toxicidade reprodutiva/ de desenvolvimento que se baseia na experiência adquirida nos países membros ao utilizar o método original em substâncias químicas de elevado volume de produção e em testes exploratórios com substâncias com controle positivo[3,4] e uma parte repetida da dose de toxicidade, em concordância com a Diretriz de Teste (DT) 407.

3. Esta DT foi atualizada com pontos finais relevantes para o desregulador endócrino, como um seguimento da atividade de alta prioridade iniciada na OECD em 1998 para revisar as Diretrizes de Teste existentes e desenvolver novas Diretrizes para a triagem e teste de possíveis desreguladores endócrinos[5]. Neste contexto, a DT 407 (Estudo de toxicidade oral por dose repetida de 28 dias em roedores) foi melhorada em 2008 por parâmetros adequados para detectar a atividade endócrina de substâncias químicas de teste. O objetivo da atualização do DT 422 foi incluir alguns pontos finais relevantes para os desreguladores endócrinos nas DTs de triagem, nas quais os intervalos de exposição cobrem alguns dos períodos sensíveis durante o desenvolvimento (períodos pré ou pós-natais).

4. Os pontos finais relevantes selecionados para o desregulador endócrino, também parte da DT 443 (Estudo de toxicidade reprodutiva estendida a uma geração), foram incluídos na DT 422 com base em um estudo de viabilidade, abordando questões científicas e técnicas relacionadas à sua inclusão, bem como possíveis adaptações do desenho do teste necessário para sua inclusão[6].

5. Esta Diretriz foi desenvolvida para gerar informações limitadas sobre os efeitos de uma substância química de teste no desempenho reprodutivo masculino e feminino, como função gonadal, comportamento de acasalamento, concepção, desenvolvimento do concepto e parto. Não é uma alternativa, nem substitui as Diretrizes de Teste 414, 415, 416 ou 443 existentes.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

6. Na avaliação e estudo das características tóxicas de uma substância química de teste, a determinação da toxicidade por via oral com doses repetidas pode ser realizada após a informação inicial sobre a toxicidade, obtida por testes agudos. Este estudo fornece informações sobre os possíveis riscos à saúde, que possam surgir da exposição repetida durante um período de tempo relativamente limitado. O método compreende o estudo básico de toxicidade de dose repetida, que pode ser usado para substâncias químicas, nos quais 90 dias de estudo não são garantidos (quando o volume de produção não excede certos limites) ou como um estudo preliminar para um estudo de longo prazo. Na condução do estudo, os princípios orientadores e considerações delineadas no Documento de Orientação OECD nº 19 sobre o reconhecimento, avaliação e uso de sinais clínicos como parâmetros humanos para animais experimentais usados em avaliações de segurança[7] devem ser seguidos.

7. Compreende ainda um teste de triagem de toxicidade reprodutiva/ de desenvolvimento e, portanto, também pode ser usado para fornecer informações iniciais sobre possíveis efeitos no desempenho reprodutivo masculino e feminino, como função gonadal, comportamento de acasalamento, concepção, desenvolvimento do concepto e parto; quer numa fase inicial de avaliação das propriedades toxicológicas dos substâncias químicas de teste, quer em substâncias químicas de teste preocupantes.

Este teste não fornece informações completas sobre todos os aspectos da reprodução e desenvolvimento. Em particular, oferece apenas meios limitados de detecção de manifestações pós-natais de exposição pré-natal, ou efeitos que podem ser induzidos durante a exposição pós-natal. Devido (entre outras razões) à seletividade dos pontos de término e à curta duração do estudo, este método não fornecerá evidências para reivindicações definitivas de nenhum efeito de re-

produção/ desenvolvimento. Além disso, na ausência de dados de outros testes de toxicidade de reprodução/ desenvolvimento, os resultados positivos são úteis para a avaliação inicial de riscos e contribuem para decisões com relação à necessidade e ao momento de testes adicionais.

8. Os resultados obtidos pelos parâmetros relacionados com a glândula endócrina devem ser vistos no contexto da "Estrutura Conceitual da OECD para Testes e Avaliação de Substâncias químicas de Desregulação Endócrina"[8]. Nesta Estrutura Conceitual, o DT 422 melhorada está contida no nível 4 como um ensaio *in vivo*, fornecendo dados sobre efeitos adversos em pontos de término endócrinos relevantes. No entanto, um sinal endócrino pode não ser considerado prova suficiente de que a substância química em teste é um desregulador endócrino.

9. A Diretriz também coloca ênfase nos efeitos neurológicos como um ponto de término específico e enfatiza a necessidade de observações clínicas cuidadosas dos animais, de modo a obter o máximo de informação possível. O método deve identificar substâncias químicas com potencial neurotóxico e que podem justificar uma investigação mais aprofundada sobre esse aspecto. Todavia, o método também pode fornecer uma indicação básica dos efeitos imunológicos.

10. Na ausência de dados de outros estudos de toxicidade sistêmica, de toxicidade reprodutiva/ de desenvolvimento, de neurotoxicidade e/ou de imunotoxicidade, os resultados positivos são úteis para a avaliação inicial de riscos e contribuem para decisões relacionadas à necessidade e ao momento de testes adicionais.

O teste pode ser particularmente útil como parte do Conjunto de Dados de Informação de Triagem (CDIT, em inglês Screening Information Data-set, SIDS) para avaliação de substâncias químicas existentes, para os quais pouca ou nenhuma informação toxicológica está disponível e pode servir como uma alternativa para conduzir dois testes separados: para toxicidade de dose repetida (Diretriz 407) e toxicidade reprodutiva/ de desenvolvimento (Diretriz 421), respectivamente. Ele também pode ser usado como um estudo de descoberta de faixa de dose para estudos de reprodução/ desenvolvimento mais extensos, ou quando considerado relevante.

11. Geralmente, assume-se que existem diferenças na sensibilidade entre animais prenhas e não prenhas. Consequentemente, pode ser mais complicado determi-

nar os níveis de dose neste teste combinado, que sejam adequados para avaliar tanto a toxicidade sistêmica geral, quanto a toxicidade específica de reprodução/ desenvolvimento, em vez de testes individuais conduzidos separadamente. Contudo, a interpretação dos resultados do teste em relação à toxicidade sistêmica geral pode ser mais difícil do que quando se realiza um estudo separado de dose repetida, especialmente quando os parâmetros séricos e histopatológicos não são avaliados ao mesmo tempo no estudo. Devido a essas complexidades técnicas, uma experiência considerável em avaliação de toxicidade é necessária para a realização deste teste de triagem combinado. Por outro lado, apesar do menor número de animais, o teste combinado pode oferecer um meio melhor de discriminar os efeitos diretos sobre a reprodução/ desenvolvimento daqueles que são secundários a outros efeitos (sistêmicos).

12. Neste teste, o período de dosagem é mais longo do que num estudo convencional de dose repetida de 28 dias. No entanto, utiliza menos animais de cada sexo por grupo, quando comparado um estudo convencional de dose repetida de 28 dias, em adição a um Teste de Triagem de Reprodução/ Toxicidade no Desenvolvimento.

13. Esta Diretriz pressupõe a administração oral da substância química de teste. Modificações podem ser necessárias se outras vias de exposição forem usadas.

14. Antes de usar a Diretriz de Teste em uma mistura para gerar dados para uma finalidade regulatória pretendida, deve-se considerar se e por que ela pode fornecer resultados adequados para essa finalidade. Tais considerações não são necessárias, quando há uma exigência regulamentar para o teste da mistura.

15. As definições utilizadas são apresentadas no anexo 1.

PRINCÍPIO DO TESTE

16. A substância química em estudo é administrada em doses graduadas a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos devem receber uma dose mínima de quatro semanas, até o dia anterior ao sacrifício programado (isso inclui um mínimo de duas semanas antes do acasalamento, durante o período de acasalamento e, aproximadamente, duas semanas após o acasalamento). Tendo em conta o

limitado período de dosagem pré-acasalamento nos machos, a fertilidade pode não ser um indicador particularmente sensível da toxicidade testicular. Portanto, um exame histológico detalhado dos testículos é essencial. A combinação de um período de dosagem pré-acasalamento de duas semanas e subsequentes observações de acasalamento/ fertilidade em um período de dosagem global de, pelo menos, quatro semanas, seguida de histopatologia detalhada das gônadas masculinas, é considerada suficiente para permitir a detecção da maioria dos efeitos sobre fertilidade masculina e espermatogênese.

17. As fêmeas devem ser tratadas durante todo o estudo. Isso inclui duas semanas antes do acasalamento (com o objetivo de cobrir, pelo menos, dois ciclos de cio completos), o tempo variável até a concepção, a duração da gestação e, pelo menos, treze dias após o parto, até e inclusive no dia anterior ao sacrifício programado.

18. A duração do estudo, após a aclimatação e pré-dosagem da avaliação do ciclo de cio, depende do desempenho feminino e é de aproximadamente 63 dias, [pelo menos 14 dias antes do acasalamento, (até) 14 dias de acasalamento, 22 dias de gestação, 13 dias de lactação].

19. Durante o período de administração, os animais são observados de perto a cada dia quanto a sinais de toxicidade. Os animais que morrem ou são eutanasiados durante o teste são necropsiados e, na conclusão do teste, os animais sobreviventes são sacrificados e necropsiados.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção de espécies animais

20. Esta Diretriz de Teste é projetada para uso com o rato. Deve se dar uma justificativa detalhada se os parâmetros especificados dentro deste DT 422 forem investigados em outra espécie de roedor. No programa internacional de validação para a detecção de desreguladores endócrinos no DT 407, o rato foi a única espécie utilizada. Linhagens com baixa fecundidade ou alta incidência bem conhecida de defeitos de desenvolvimento não devem ser usadas. Animais virgens saudáveis, não submetidos a procedimentos experimentais anteriores, devem ser usados. Os animais de teste devem ser caracterizados quanto à espécie, linhagem, sexo, peso e idade. No início do estudo, a variação de peso dos

animais utilizados deve ser mínima e não exceder ± 20% do peso médio de cada sexo. Quando o estudo é conduzido como um experimento preliminar para um teste de longo prazo ou de geração completa, é preferível que animais da mesma linhagem e fonte sejam usados em ambos os ensaios.

Habitação e alimentação

21. Todos os procedimentos devem estar em conformidade com os padrões locais de cuidados com animais de laboratório. A temperatura na sala do animal experimental deve ser de 22°C (±3°). A umidade relativa deve ser de pelo menos 30% e preferivelmente não exceder 70%, exceto durante a limpeza do ambiente. A iluminação deve ser artificial, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro, 12 horas escuro. Para alimentação, as dietas convencionais de laboratório podem ser usadas com um suprimento ilimitado de água potável.

A escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de assegurar uma mistura adequada de uma substância química em teste quando administrada por este método.

22. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo; os animais podem ser alojados individualmente, se for cientificamente justificado. Para o confinamento em grupo, não mais do que cinco animais devem ser alojados por caixa. Procedimentos de acasalamento devem ser realizados em caixas adequadas para o propósito. As fêmeas prenhas devem ser confinadas individualmente e providas de materiais de nidificação. Fêmeas lactantes serão alojadas individualmente com suas crias.

23. Os alimentos devem ser analisados regularmente quanto a contaminantes. Uma amostra da dieta deve ser mantida até a finalização do relatório.

Preparação dos animais

24. Animais adultos jovens e saudáveis são randomizados e designados para os grupos de tratamento e caixas. As caixas devem ser organizadas de tal forma que os possíveis efeitos gerados pelo posicionamento destas sejam minimizados. Os animais são identificados e mantidos em suas caixas por, pelo menos, cinco dias antes do início do estudo para permitir a aclimatação às condições laboratoriais.

Preparação de doses

25. Recomenda-se que a substância química em estudo seja administrada por via oral, a menos que outras vias de administração sejam consideradas mais apropriadas. Quando a via oral é selecionada, a substância química é geralmente administrada por sonda gástrica; no entanto, alternativamente, as substâncias químicas de teste podem também ser administradas através da dieta ou água potável.

26. Se necessário, a substância química em estudo é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Recomenda-se que, sempre que possível, a utilização de uma solução/ suspensão aquosa seja considerada em primeiro lugar, seguida da consideração de uma solução/ suspensão em óleo (por exemplo, óleo de milho) e depois por solução em outros veículos.

Para veículos não aquosos, as características tóxicas do veículo devem ser conhecidas. A estabilidade e a homogeneidade da substância química em teste no veículo devem ser determinadas.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

27. Recomenda-se que cada grupo seja iniciado com pelo menos 10 machos e 12-13 fêmeas. As fêmeas serão avaliadas pré-exposição para a ciclagem do cio e os animais que não apresentarem ciclos típicos de 4-5 dias não serão incluídos no estudo; portanto, fêmeas extras são recomendadas para garantir 10 fêmeas por grupo. Exceto no caso de efeitos tóxicos marcantes, espera-se que isso forneça, pelo menos, 8 fêmeas prenhas por grupo, número mínimo aceitável de fêmeas prenhas por grupo. O objetivo é produzir gestações e descendentes suficientes para assegurar uma avaliação significativa do potencial da substância química em estudo para afetar a fertilidade, a gestação, o comportamento materno/ de aleitamento e o crescimento/ desenvolvimento da descendência F1 desde a concepção até o dia 13º. pós-parto. Se mortes interinas forem planejadas, o número deve ser aumentado pelo número de animais programados para serem mortos antes da conclusão do estudo. Deve-se considerar um grupo satélite adicional de cinco animais por sexo no grupo controle e no grupo de dose máxima

para observação de reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos sistêmicos, por pelo menos, 14 dias após o tratamento. Os animais dos grupos satélites não serão acasalados e, consequentemente, não serão utilizados para a avaliação da toxicidade reprodutiva/ de desenvolvimento.

Dosagem

28. Pelo menos três grupos de teste e um grupo de controle devem ser usados. Se não houver dados de toxicidade geral adequados disponíveis, um estudo de faixas pode ser realizado (animais da mesma linhagem e fonte) para auxiliar na determinação das doses a serem usadas.

Exceto para o tratamento com a substância química em teste, os animais do grupo controle devem ser manipulados de maneira idêntica aos participantes do grupo de teste. Se um veículo é usado na administração da substância química em teste, o grupo de controle deve receber o veículo no maior volume usado.

29. Os níveis de dose devem ser selecionados levando em conta qualquer toxicidade existente e dados (toxico-) cinéticos disponíveis. Também deve ser levado em conta que pode haver diferenças na sensibilidade entre fêmeas prenhas e não prenhas. O nível de dose mais alto deve ser escolhido com o objetivo de induzir efeitos tóxicos, mas não morte, nem sofrimento evidente. Posteriormente, uma sequência descendente de níveis de dose deve ser selecionada com vista a demonstrar qualquer resposta relacionada com a dosagem e sem efeitos adversos ao nível de dose mais baixo. Intervalos de duas a quatro vezes são ótimos e a adição de um quarto grupo de teste é preferível para se usar em intervalos muito grandes (por exemplo, mais de um fator de 10) entre as dosagens.

30. Na presença de toxicidade geral observada (redução do peso corporal, fígado, coração, pulmões ou rins, etc.) ou outras alterações que possam não ser respostas tóxicas (redução da ingestão de alimentos, aumento do fígado), os efeitos observados nos pontos finais sensíveis do sistema endócrino devem ser interpretados com cautela.

Teste de limite

31. Se um estudo oral a uma dose de pelo menos 1.000mg/kg de peso corporal/ dia ou, para administração dietética, uma percentagem equivalente na dieta ou

água potável (com base nas determinações do peso corporal), utilizando os procedimentos descritos para este estudo não produzir efeitos tóxicos observáveis e se não for esperada toxicidade com base em dados de substâncias estruturalmente relacionadas, um estudo completo, utilizando vários níveis de dose, pode não ser necessário. O teste limite aplica-se, exceto quando a exposição humana indica a necessidade de um nível de dose mais alto a ser usado. Para outros tipos de administração, como inalação ou na aplicação dérmica, as propriedades físico-químicas das substâncias de ensaio podem frequentemente determinar a exposição máxima atingível.

Administração de doses

32. Os animais são tratados com a substância química de teste diariamente durante 7 dias por semana. Quando a substância química em estudo é administrado por sonda esofágica, isto deve ser feito em dose única, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de uma só vez depende do tamanho do animal. O volume não deve exceder 1ml/100g de peso corporal, exceto no caso de soluções aquosas, em que podem ser utilizados 2ml/100g de massa corporal. Exceto para substâncias químicas irritantes ou corrosivas, que normalmente revelam efeitos exacerbados com concentrações mais altas, a variabilidade no volume do teste deve ser minimizada, ajustando a concentração para garantir um volume constante em todos os níveis de dosagem.

33. Para substâncias químicas de teste administradas através da dieta ou água potável, é importante assegurar que as quantidades da substância química envolvidas não interfiram na nutrição normal ou no balanço hídrico. Quando a substância química em estudo é administrado na dieta, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante (ppm) ou um nível de dose constante em termos do peso corporal dos animais; a alternativa usada deve ser especificada. Para um teste químico administrado por sonda gástrica, a dose deve ser administrada em horários semelhantes todos os dias e ajustada, pelo menos, semanalmente para manter um nível de dose constante em termos de peso corporal do animal. Quando o estudo combinado for utilizado como preliminar para um estudo de toxicidade de longo prazo ou de reprodução completa, uma dieta semelhante deve ser usada em ambos os estudos.

Horário Experimental

34. A dosagem de ambos os sexos deve começar 2 semanas antes do acasalamento, depois de terem sido aclimatados durante pelo menos cinco dias e as fêmeas terem sido rastreadas quanto a ciclos de cio normais (num período de 2 semanas antes do tratamento). O estudo deve ser programado de tal forma que a avaliação do ciclo de cio comece logo após os animais terem atingido a maturidade sexual completa. Isto pode variar ligeiramente para diferentes linhagens de ratos em diferentes laboratórios, por exemplo, Ratos Sprague Dawley com 10 semanas de idade, ratos Wistar com cerca de 12 semanas de idade.

Fêmeas paridas com filhotes devem ser sacrificados no dia 13 pós-parto, ou logo depois. Para permitir o jejum noturno de mães antes da coleta de sangue (se esta opção for a preferida), as mães e suas crias não precisam necessariamente ser sacrificados no mesmo dia. O dia do nascimento (ou seja, quando o parto está completo) é definido como dia 0 pós-parto. As fêmeas que não apresentam evidência de cópula são sacrificadas 24 a 26 dias após o último dia do período de acasalamento. A dosagem é continuada em ambos os sexos durante o período de acasalamento. Os machos devem ser tratados após o período de acasalamento, pelo menos, até que o período de dosagem total mínimo de 28 dias tenha sido completado. Eles são então sacrificados, ou, alternativamente, são retidos e continuam sendo dosados para a possível condução de um segundo acasalamento, se considerado apropriado.

35. A dosagem diária das fêmeas parentais deve continuar durante toda a gestação e, pelo menos, até, inclusive, no dia 13º. pós-parto ou no dia anterior ao sacrifício. Para estudos em que a substância química em teste é administrada por inalação ou por via cutânea, a administração deve ser continuada, pelo menos, até ao dia 19º. de gestação e a administração deve ser reiniciada o mais rapidamente possível e não depois do PND4.

36. Animais em um grupo satélite programado para observações de acompanhamento, se incluídos, não são acasalados. Eles devem ser mantidos, pelo menos, por mais 14 dias após a primeira eutanásia programada das mães, sem tratamento para detectar a ocorrência tardia, persistência ou recuperação de efeitos tóxicos.

37. Um diagrama do cronograma experimental é dado no anexo 2.

Ciclos de cio

38. Os ciclos de cio devem ser monitorados antes do tratamento começar para selecionar as fêmeas do estudo com ciclicidade regular (ver parágrafo 27). Esfregaços vaginais também devem ser monitorados diariamente desde o início do período de tratamento até a evidência de acasalamento. Se houver preocupação com os efeitos do estresse agudo que podem alterar os ciclos de cio pelo início do tratamento, os laboratórios podem expor os animais durante 2 semanas e coletar esfregaços vaginais diariamente para monitorar o ciclo de cio por, no mínimo, duas semanas durante o período de pré-acasalamento, monitorando continuamente o processo, até que haja evidência de acasalamento. Ao se obter células vaginais/ cervicais, deve-se tomar cuidado para evitar distúrbios da mucosa, o que poderia induzir a pseudogestação[8,9].

Procedimento de acasalamento

39. Normalmente, os acasalamentos 1: 1 (um macho para uma fêmea) devem ser usados neste estudo. Exceções podem surgir no caso de mortes ocasionais de machos. A fêmea deve ser colocada com o mesmo macho até que se observe evidência de cópula ou tenham decorrido duas semanas. Todas as manhãs, as fêmeas devem ser examinadas quanto à presença de espermatozoides ou de um tampão vaginal. Dia 0 da gestação é definido como o dia em que as provas de acasalamento são confirmadas (um tampão vaginal ou espermatozoide é encontrado). Caso o pareamento não tenha sido bem-sucedido, pode-se considerar o reacasalamento de fêmeas com machos comprovados do mesmo grupo.

Tamanho da ninhada

40. No dia 4 após o nascimento, o tamanho de cada ninhada pode ser ajustado eliminando os filhotes extras por seleção aleatória para produzir, o quanto seja possível, quatro ou cinco filhotes por sexo por ninhada, dependendo do tamanho normal da ninhada na linhagem de ratos. Amostras de sangue devem ser coletadas de dois dos filhotes excedentes, agrupadas e usadas para a determinação dos níveis séricos de T4. Eliminação seletiva dos filhotes, com base no peso corporal ou distância anogenital (DAG, ou AGD, em inglês) não é apropriado. Sempre que o número de filhotes machos ou fêmeas não seja quatro ou cinco de cada sexo por ninhada, o ajuste parcial (por exemplo, seis machos e quatro fêmeas) é aceitável. Nenhum filhote será eliminado quando o tamanho da ninhada cair abaixo do alvo de descarte (8 ou 10 filhotes/ ninhada). Se houver apenas um

filhote disponível acima do alvo de descarte, apenas um filhote será eliminado e usado para coleta de sangue para possíveis avaliações de T4 sérico.

41. Se o tamanho da ninhada não for ajustado, dois filhotes por ninhada são sacrificados no dia 4 após o nascimento e amostras de sangue são coletadas para a medição das concentrações séricas dos hormônios tireoidianos.

Se possível, os dois filhotes por ninhada devem ser fêmeas para reservar filhotes machos para avaliações de retenção de mamilos, exceto no caso em que a remoção desses filhotes não deixe nenhuma fêmea restante para avaliação na finalização. Nenhum filhote será eliminado quando o tamanho da ninhada ficar abaixo de 8 ou 10 filhotes/ ninhada (dependendo do tamanho normal da ninhada na linhagem de ratos usada). Se houver apenas um filhote disponível acima do tamanho normal da ninhada, apenas um filhote será eliminado e usado para coleta de sangue para possíveis avaliações de T4 sérico.

Observações

42. As observações clínicas gerais devem ser feitas pelo menos uma vez por dia, de preferência no mesmo horário todos os dias, considerando o período de pico dos efeitos previstos após a dosagem. A condição de saúde dos animais deve ser registrada. Pelo menos, duas vezes por dia todos os animais são observados quanto à morbidade e mortalidade.

43. Observações clínicas detalhadas devem ser feitas em todos os animais parentais uma vez antes da primeira exposição (para permitir comparações dentro do indivíduo), e, pelo menos, uma vez por semana depois disso. Essas observações devem ser feitas fora da caixa em uma área/ local padrão e, de preferência, no mesmo horário, todos os dias. Elas devem ser cuidadosamente registradas, preferencialmente usando sistemas de pontuação, definidos pelo laboratório. Esforços devem ser feitos para garantir que as variações nas condições de teste sejam mínimas e que as observações sejam conduzidas, preferencialmente, por observadores que desconhecem o tratamento. Os sinais observados devem incluir, entre outros, alterações na pele, pelos, olhos, membranas mucosas, ocorrência de secreções e excreções e atividade autônoma (por exemplo, lacrimação, pilo-ereção, tamanho da pupila, padrão respiratório incomum). Mudanças na marcha, postura e resposta ao manuseio, bem como a presença de movimentos

clônicos ou tônicos, estereotipias (limpeza excessiva, ciclos repetitivos), partos difíceis ou prolongados ou comportamento bizarro (automutilação, andar para trás) também devem ser registrados[10].

44. Em uma ocasião durante o estudo, a reatividade sensorial a estímulos de diferentes modalidades (estímulos auditivos, visuais e proprioceptivos)[8,9,11], avaliação da força de preensão[12] e avaliação da atividade motora[13] deve ser avaliada em cinco machos e cinco fêmeas, selecionados aleatoriamente de cada grupo. Mais detalhes sobre os procedimentos que podem ser seguidos são fornecidos nas respectivas referências. No entanto, procedimentos alternativos, além daqueles referenciados, também podem ser usados. Nos machos, estas observações funcionais devem ser feitas no final do período de dosagem, pouco antes da eutanásia programada, mas antes da amostragem de sangue para hematologia ou química clínica (ver parágrafos 53-56, incluindo a nota de rodapé 1). As fêmeas devem estar num estado fisiologicamente semelhante durante estes testes funcionais e devem, preferencialmente, ser testadas uma vez durante a última semana de lactação (por exemplo, DL 6-13), pouco antes da eutanásia programada. Na medida do possível, minimize os tempos de separação das mães e filhotes.

45. Observações funcionais, feitas uma vez no final do estudo, podem ser omitidas quando o estudo é conduzido como um teste preliminar para um estudo subsequente subcrônico (90 dias) ou de longo prazo. Nesse caso, as observações funcionais devem ser incluídas no estudo de acompanhamento. Por outro lado, a disponibilidade de dados sobre observações funcionais a partir deste estudo de dose repetida pode aumentar a capacidade de selecionar os níveis de dose para um estudo subsequente subcrônico ou de longo prazo.

46. Como exceção, observações funcionais também podem ser omitidas para grupos que, de outra forma, revelariam sinais de toxicidade em uma extensão que poderia interferir significativamente no desempenho do teste funcional.

47. A duração da gestação deve ser registrada e é calculada a partir do dia 0 da gestação. Cada ninhada deve ser examinada o mais cedo possível após o parto para estabelecer o número e o sexo dos filhotes, natimortos, nascidos vivos, nanicos (filhotes que são significativamente menores que os filhotes de controle correspondentes) e a presença de anormalidades grosseiras.

48. Os filhotes vivos devem ser contados e sexuados e as ninhadas pesadas dentro de 24 horas do parto (dia 0 ou 1 pós-parto) e pelo menos no dia 4 e no dia 13 após o parto. Além das observações sobre os animais progenitores (ver parágrafos 43 e 44), deve ser registrado qualquer comportamento anormal da descendência.

49. O AGD de cada filhote deve ser medido no mesmo dia pós-parto entre PND 0 até PND 4. O peso corporal do filhote deve ser coletado no dia em que o AGD é medido e o AGD deve ser normalizado com uma medida do tamanho do filhote, de preferência raiz cúbica do peso corporal[14]. O número de mamilos/ aréolas nos filhotes machos deve ser contado no PND 12 ou 13, conforme recomendado na OECD DT 151[15].

Peso corporal e consumo de alimentos/ água

50. Machos e fêmeas devem ser pesados no primeiro dia da dosagem, pelo menos uma vez por semana, e no término. Durante a gestação, as fêmeas devem ser pesadas nos dias 0, 7, 14 e 20 e dentro de 24 horas do parto (dia 0 ou 1 pós-parto), e pelo menos no dia 4 e dia 13 após o parto. Essas observações devem ser relatadas individualmente para cada animal adulto.

51. Durante o período de pré-acasalamento, gestação e aleitamento, o consumo de alimentos deve ser medido, pelo menos, semanalmente. A medição do consumo de alimentos durante o acasalamento é opcional. O consumo de água durante estes períodos também deve ser medido, quando a substância química em teste é administrado por esse meio.

Hematologia

52. Uma vez durante o estudo, os seguintes exames hematológicos devem ser feitos em cinco machos e cinco fêmeas selecionados aleatoriamente de cada grupo: hematócrito, concentrações de hemoglobina, contagem de eritrócitos, reticulócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e uma medida do tempo/ potencial de coagulação sanguínea. Outras determinações que devem ser realizadas, se a substância em estudo ou os seus metabolitos putativos têm ou são suspeitos de ter propriedades oxidantes, incluem a concentração de meta-hemoglobina e os corpos de Heinz.

53. As amostras de sangue devem ser coletadas de um local definido. As fêmeas devem estar num estado fisiologicamente semelhante durante a amostragem. A fim de evitar dificuldades práticas relacionadas à variabilidade no início da gestação, a coleta de sangue em fêmeas pode ser feita no final do período de pré-acasalamento como uma alternativa à amostragem imediatamente antes ou como parte do procedimento de eutanásia. Amostras de sangue de machos devem preferencialmente ser tomadas imediatamente antes ou como parte do procedimento para a eutanásia. Alternativamente, a coleta de sangue em machos também pode ser feita no final do período de pré-acasalamento, quando este momento for preferido para as fêmeas.

54. As amostras de sangue devem ser armazenadas sob condições apropriadas.

Bioquímica Clínica

55. As determinações de bioquímica clínica para investigar os principais efeitos tóxicos nos tecidos e, especificamente, os efeitos nos rins e fígado, devem ser realizadas em amostras de sangue obtidas dos cinco machos selecionados e cinco fêmeas de cada grupo. Recomenda-se jejum noturno dos animais antes da coleta de sangue[(1)]. As investigações de plasma ou soro devem incluir sódio, potássio, glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, pelo menos duas enzimas indicativas de efeitos hepatocelulares (como alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e sorbitol desidrogenase) e ácidos biliares. Medições de enzimas adicionais (de origem hepática ou outra) e bilirrubina podem fornecer informações úteis sob certas circunstâncias.

[(1)] Para um número de medições no soro e plasma, mais notavelmente para glicose, seria preferível o jejum noturno. A principal razão para essa preferência é que a variabilidade aumentada que inevitavelmente resultaria do não-jejum tenderia a mascarar efeitos mais sutis e dificultar a interpretação. Por outro lado, no entanto, o jejum noturno pode interferir no metabolismo geral dos animais (gestantes), atrapalhar a lactação e o comportamento de amamentação, e, particularmente em estudos de alimentação, pode perturbar a exposição diária à substância química em estudo. Se o jejum noturno for adotado, as determinações clínicas bioquímicas devem ser realizadas após a realização das observações funcionais na semana 4 do estudo para os homens. As mães devem ser retidas por um dia adicional após os filhotes serem removidos, (por exemplo, PND 13). As mães devem ser submetidas a jejum durante a noite a partir do dia 13-14 da lactação e o sangue terminal deve ser usado para parâmetros químicos clínicos.

56. As amostras de sangue de um local definido são tomadas com base no seguinte cronograma:

- De, pelo menos, dois filhotes por ninhada no quarto dia após o nascimento, se o número de filhotes permitir (ver parágrafos 40-41);
- De todas as mães e, pelo menos, dois filhotes por ninhada no final do dia 13;
- De todos os machos adultos, no término do estudo.

Todas as amostras de sangue são armazenadas sob condições apropriadas. Filhotes e machos adultos no dia 13 tem recolhidas amostras de sangue e são avaliados quanto aos níveis séricos de hormônios tireoidianos (T4). Uma avaliação adicional de T4 em amostras de sangue das mães e filhotes do dia 4 é feita, se relevante. Como opção, outros hormônios podem ser medidos, se relevantes. Sangue de filhote pode ser agrupado por ninhada para análises de hormônios tireoidianos. Os hormônios tireoidianos (T4 e TSH) devem preferencialmente ser medidos como "total".

57. Opcionalmente, as seguintes determinações de urinálise poderiam ser realizadas em cinco machos selecionados aleatoriamente de cada grupo, durante a última semana do estudo através de coleta de volume de urina cronometrada; aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteína, glicose e sangue/ células sanguíneas.

58. Além disso, estudos para investigar marcadores séricos de dano tecidual geral devem ser considerados. Outras determinações que devem ser realizadas se as propriedades conhecidas da substância química em estudo puderem, ou se suspeite que afetem, os perfis metabólicos relacionados incluem cálcio, fosfato, triglicérides em jejum e glicose em jejum, hormônios específicos, meta-hemoglobina e colinesterase. Estes precisam ser identificados caso a caso.

59. Os seguintes fatores podem influenciar a variabilidade e as concentrações absolutas das determinações hormonais:

- Horário da eutanásia por causa da variação diurna das concentrações hormonais;
- Método de sacrifício para evitar estresse indevido que podem afetar as concentrações hormonais;

- Os kits de teste de concentrações hormonais para determinações de hormônios que podem diferir por suas curvas padrão.

60. Amostras de plasma especificamente destinadas à determinação de hormônios devem ser coletadas em horários comparáveis ao longo do dia. Os valores numéricos obtidos ao analisar as concentrações hormonais diferem com vários kits de ensaio comercial.

61. Se os dados históricos da linha de base forem inadequados, deve-se considerar a determinação de variáveis bioquímicas hematológicas e clínicas antes do início do tratamento ou preferencialmente em um conjunto de animais não incluídos nos grupos experimentais. Para as fêmeas, os dados têm que ser de animais em lactação.

PATOLOGIA

Necropsia macroscópica

62. Todos os animais adultos do estudo devem ser submetidos a uma necropsia completa e detalhada, que inclua um exame cuidadoso da superfície externa do corpo, todos os orifícios e as cavidades craniana, torácica e abdominal, além de seu conteúdo. Atenção especial deve ser dada aos órgãos do sistema reprodutivo. O número de locais de implantação deve ser registrado. Esfregaços vaginais devem ser examinados no dia da necropsia para determinar o estágio do ciclo de cio e permitir a correlação com a histopatologia dos órgãos reprodutivos femininos.

63. Os testículos e epidídimos, assim como as próstatas e as vesículas seminais com glândulas coagulantes como um todo de todos os machos adultos devem ser separados de qualquer tecido aderente, conforme apropriado, e seu peso úmido deve ser tomado o mais rápido possível após a dissecação para evitar a secagem. Além disso, os pesos de órgãos opcionais podem incluir o músculo levantador do ânus e o complexo do músculo bulbocavernoso, as glândulas de Cowper e a glande peniana nos machos e ovários emparelhados (peso úmido) e útero (incluindo o colo do útero) nas fêmeas; se incluídos, esses pesos devem ser coletados o mais rapidamente possível após a dissecação. Os ovários, testículos, epidídimos, órgãos sexuais acessórios e todos os órgãos que apresentem lesões macroscópicas de todos os animais adultos devem ser preservados.

64. A glândula tireoide de todos os machos e fêmeas adultos, e de um filhote macho e um fêmea de 13 dias de cada ninhada, devem ser preservados no meio de fixação mais apropriado para o exame histopatológico subsequente. O peso da tireoide pode ser determinado após a fixação. O corte também deve ser feito com muito cuidado e somente após a fixação para evitar danos aos tecidos. O dano tecidual pode comprometer a análise histopatológica. As amostras de sangue devem ser retiradas de um local identificado imediatamente antes ou como parte do procedimento para a eutanásia dos animais, armazenando as amostras sob condições apropriadas (ver parágrafo 56).

65. Além disso, para, pelo menos, cinco machos e fêmeas adultos, selecionados aleatoriamente de cada grupo (exceto os encontrados moribundos e/ou sacrificados antes do término do estudo), o fígado, os rins, as glândulas suprarrenais, o timo, o baço, o cérebro e coração deve ser separados de qualquer tecido aderente, conforme apropriado e seu peso úmido devem ser medidos o mais rápido possível após a dissecação para evitar a secagem. Os tecidos seguintes devem ser conservados no meio de fixação mais adequado, tanto para o tipo de tecido como para o exame histopatológico subsequente: todas as lesões macroscópicas, cérebro (regiões representativas incluindo cérebro, cerebelo e ponte), medula espinal, olho, estômago, intestinos grossos (incluindo manchas de Peyer), fígado, rins, suprarrenais, baço, coração, timo, traqueia e pulmões (preservados pela inflação com fixador e depois imersão), gônadas (testículos e ovários), órgãos sexuais acessórios (útero e colo do útero, epidídimos, próstata, vesículas seminais mais glândulas coagulantes), vagina, bexiga, linfonodos (além do nódulo mais proximal, outro linfonodo deve ser tomado de acordo com a experiência do laboratório[16]), nervo periférico (ciático ou tibial) preferencialmente em proximidade com o músculo, músculo esquelético e osso, com medula óssea (seção ou, alternativamente, um novo aspirado de medula óssea montado). Recomenda-se que os testículos sejam fixados por imersão no fixador de Bouins ou de Davidson modificado[16-18]. A fixação de formalina não é recomendada para esses tecidos. A túnica albugínea pode ser perfurada suavemente e superficialmente nos dois polos do órgão com uma agulha, para permitir a rápida penetração do fixador. Os achados clínicos e outros podem sugerir a necessidade de examinar tecidos adicionais.

Também quaisquer órgãos considerados susceptíveis de serem órgãos-alvo com base nas propriedades conhecidas da substância de teste devem ser preservados.

66. Os seguintes tecidos podem dar valiosa indicação de efeitos relacionados ao sistema endócrino: gônadas (ovários e testículos), órgãos sexuais acessórios (útero incluindo colo do útero, epidídimos, vesículas seminais com glândulas de coagulação, próstata dorsolateral e ventral), vagina, pituitária, glândula mamária masculina e glândula adrenal. Alterações nas glândulas mamárias masculinas não foram suficientemente documentadas, mas este parâmetro pode ser muito sensível a substâncias com ação estrogênica. A observação de órgãos/ tecidos que não estão listados no parágrafo 65 é opcional.

67. Filhotes mortos e filhotes eutanasiados no dia 13 pós-parto, ou logo depois, devem, pelo menos, ser cuidadosamente examinados externamente em busca de anormalidades grosseiras. Deve-se prestar atenção especial aos genitais reprodutivos externos, que devem ser examinados em busca de sinais de desenvolvimento alterado.

Histopatologia

68. A histopatologia completa deve ser realizada nos órgãos e tecidos preservados dos animais selecionados nos grupos controle e dose alta (com ênfase especial nos estágios de espermatogênese nas gônadas masculinas e na histopatologia da estrutura das células testiculares intersticiais). A glândula tireoide dos filhotes e dos animais adultos remanescentes pode ser examinada quando necessário. Estes exames devem ser estendidos aos animais de outros grupos de dosagem, se as alterações relacionadas ao tratamento forem observadas no grupo de altas doses. A Diretriz de Histopatologia[10] detalha informações extras sobre dissecação, fixação, seccionamento e histopatologia dos tecidos endócrinos.

69. Todas as lesões macroscópicas devem ser examinadas. Para auxiliar na elucidação dos NOAELs (nível de efeito adverso não-observado, em inglês No Observed Adverse Effect Level), órgãos-alvo em outros grupos de dose devem ser examinados, particularmente em grupos que alegam mostrar um NOAEL.

70. Quando um grupo satélite é utilizado, a histopatologia deve ser realizada em tecidos e órgãos identificados como apresentando efeitos nos grupos tratados.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

71. Devem ser fornecidos dados individuais sobre os animais. Portanto, todos os

dados devem ser resumidos em forma de tabela, mostrando para cada grupo de teste o número de animais no início do teste, o número de animais encontrados mortos durante o teste ou eutanasiados, o tempo de qualquer morte ou eutanásia, o número de animais férteis, o número de fêmeas prenhas, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados, incluindo o tempo de início, duração e gravidade de quaisquer efeitos tóxicos, os tipos de alterações histopatológica, e todos os dados relevantes da ninhada. Um formato de relatório tabelar, que provou ser muito útil para a avaliação dos efeitos reprodutivos/ de desenvolvimento, é dado no anexo 3.

72. Quando possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por um método estatístico apropriado e aceito. Comparações do efeito ao longo de um intervalo de dose devem evitar o uso de múltiplos testes-t. Os métodos estatísticos devem ser selecionados durante o desenho do estudo. A análise estatística da retenção de AGD e de mamilos deve ser baseada em dados individuais dos filhotes, levando em conta os efeitos da ninhada. Quando apropriado, a ninhada é a unidade de análise. A análise estatística do peso corporal dos filhotes deve ser baseada em dados individuais dos filhotes, levando em consideração o tamanho da ninhada. Devido às dimensões limitadas do estudo, as análises estatísticas na forma de testes para "significância" são de valor limitado para muitos pontos finais, especialmente os reprodutivos. Alguns dos métodos mais utilizados, especialmente testes paramétricos para medidas de tendência central, são inadequados. Se forem utilizadas análises estatísticas, o método escolhido deve ser apropriado para a distribuição da variável examinada e selecionado antes do início do estudo.

Avaliação de resultados

73. Os resultados do estudo de toxicidade devem ser avaliados em termos dos efeitos observados, necropsia e achados microscópicos.

A avaliação incluirá a relação entre a dose da substância química em estudo e a presença ou ausência, incidência e gravidade das anormalidades, incluindo lesões macroscópicas, órgãos-alvo identificados, infertilidade, anormalidades clínicas, desempenho reprodutivo afetado e efeitos sobre a ninhada, alterações no peso corporal, efeitos sobre mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos.

74. Devido ao curto período de tratamento do macho, a histopatologia dos tes-

tículos e epidídimos deve ser considerada juntamente com os dados de fertilidade, quando se avaliam os efeitos de reprodução em machos. A utilização de dados históricos de controle sobre a reprodução/ desenvolvimento (por exemplo, para tamanho da ninhada, AGD, retenção do mamilo, níveis de T4 no soro), quando disponível, também pode ser útil como auxiliar para a interpretação do estudo.

75. Para o controle de qualidade, propõe-se a coleta de dados históricos de controle e o cálculo dos coeficientes de variação numérica dos dados, especialmente para os parâmetros ligados à detecção de desreguladores endócrinos. Esses dados podem ser usados para fins de comparação quando estudos reais são avaliados.

Relatório de teste

76. O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

Produto Químico de Teste:

- Fonte, número de lote, data limite de utilização, se disponível;
- Estabilidade da substância química em estudo, se conhecida.

Substância monoconstituinte:

- Aparência física, solubilidade em água e propriedades físico-químicas relevantes adicionais;
- Identificação química, como o nome IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, conforme apropriado e praticamente viável, etc.

Substância multiconstituinte, UVBCs e misturas:

- Caracterizado, tanto quanto possível, por identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos constituintes.

Veículo (se apropriado):

- Justificativa para a escolha do veículo, se não for a água.

Teste de animais:

- Espécie/ linhagem utilizada;
- Número, idade e sexo dos animais;
- Fonte, condições de alojamento, dieta, etc.;

- Pesos individuais dos animais no início do teste;
- Justificativa para espécies, se não for rato.

Condições de teste:

- Razões para seleção do nível de dose;
- Detalhes da formulação química do teste/ preparação da dieta, concentração alcançada, estabilidade e homogeneidade da preparação;
- Detalhes da administração da substância química em estudo;
- Conversão da concentração química (ppm) do teste de dieta/ água potável para a dose real (mg/kg peso corporal/ dia), se aplicável;
- Detalhes da qualidade dos alimentos e da água;
- Descrição detalhada do procedimento de aleatorização, para selecionar as crias para eutanásia, se forem abatidas.

Resultados:

- Peso corporal/ alterações do peso corporal;
- Consumo de alimentos e consumo de água, se aplicável;
- Dados de resposta tóxica por sexo e dose, incluindo fertilidade, gestação e quaisquer outros sinais de toxicidade;
- Duração da gestação;
- Efeitos tóxicos ou outros efeitos na reprodução, descendência, crescimento pós-natal, etc.;
- Natureza, severidade e duração das observações clínicas (reversíveis ou não);
- Atividade sensorial, força de preensão e avaliação da atividade motora;
- Testes hematológicos com valores relevantes da linha de base;
- Testes bioquímicos clínicos com valores relevantes da linha de base;
- Número de fêmeas adultas com ciclo de cio normal e anormal e duração do ciclo;
- Número de nascidos vivos e perda pós-implante;
- Número de filhotes com anormalidades grosseiras e evidentes; avaliação bruta da genitália externa;
- Número de nanicos;

- Horário da morte durante o estudo ou se os animais sobreviveram à terminação;
- Número de implantes, tamanho da ninhada e peso da ninhada;
- Tempo de gravação de registro;
- Dados de peso corporal de filhotes; AGD de todos os filhotes (e peso corporal no dia da medição AGD);
- Retenção de mamilo em filhotes machos;
- Níveis hormonais da tiroide, filhotes do dia 13 e machos adultos (e mães e filhotes do dia 4, se medido);
- Peso corporal ao sacrifício e dados de peso dos órgãos para os animais parentais;
- Achados de necropsia;
- Descrição detalhada dos achados histopatológicos;
- Dados de absorção (se disponíveis);
- Tratamento estatístico dos resultados, quando apropriado.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

Interpretação de resultados

77. O estudo fornecerá avaliações da toxicidade reprodutiva/ de desenvolvimento associada à administração de doses repetidas. Em particular, dado que a ênfase é colocada na toxicidade geral e nos parâmetros de reprodução/ desenvolvimento, os resultados do estudo permitirão a discriminação entre efeitos de reprodução/ desenvolvimento ocorrendo na ausência de toxicidade geral e aqueles que são apenas expressos em níveis que são também tóxicos para os animais progenitores (ver pontos 7-11). Pode fornecer uma indicação da necessidade de conduzir investigações adicionais e orientação na elaboração de estudos subsequentes. O documento de orientação da OECD 43 deve ser consultado para auxílio na interpretação de resultados de reprodução e desenvolvimento[19]. O Documento de Orientação 106 da OECD sobre Avaliação Histológica de Testes Endócrinos e Reprodutivos em Roedores[16] fornece informações sobre a preparação e avaliação de órgãos (endócrinos) e esfregaços vaginais que podem ser úteis para esse DT.

LITERATURA

(1) OECD (1990). Room Document Nº 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available up on request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. Toxicol, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. Toxicol., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of DT 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (Nº 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) Goldman J. M., Murr A. S., Buckalew A. R., Ferrell J. M. and Cooper R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (Nº 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip StrenDT h of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD. (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD. (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (Nº 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ANEXO 1

Definições (ver também[20] OECD TG 150)

Androgenicidade: é a capacidade de uma substância química agir como um hormônio androgênico natural (por exemplo, testosterona) em um mamífero.

Antiandrogenicidade: é a capacidade de uma substância química suprimir a ação de um hormônio androgênico natural (por exemplo, a testosterona) em um mamífero.

Antioestrogenicidade: é a capacidade de uma substância química suprimir a ação de um hormônio estrogênico natural (por exemplo, o estradiol 17ß) em um mamífero.

Atividade antitireoidiana: é a capacidade de uma substância química suprimir a ação de um hormônio tireoidiano natural (por exemplo, T3) em um mamífero.

Toxicidade no desenvolvimento: a manifestação de toxicidade reprodutiva, representando transtornos pré e pós-natais, estruturais ou funcionais na progênie.

Dose: é a quantidade de substância química de teste administrada. A dose é expressa como peso da substância química em teste por unidade de peso corporal do animal de teste por dia (por exemplo, mg/kg de peso corporal/dia), ou como uma concentração alimentar constante.

Dosagem: é um termo geral que compreende a dose, a sua frequência e a duração da dosagem.

Toxicidade evidente: é um termo geral que descreve sinais claros de toxicidade após a administração da substância química em teste. Estes devem ser suficientes para a avaliação dos perigos e devem ser tais que se possa esperar que um aumento na dose administrada resulte no desenvolvimento de sinais tóxicos graves e de provável mortalidade.

Comprometimento da fertilidade: representa distúrbios de funções reprodutivas masculinas ou femininas ou capacidade.

Toxicidade materna: efeitos adversos em fêmeas prenhas, ocorrendo especificamente (efeito direto) ou não especificamente (efeito indireto) e estando relacionados ao estado gestacional.

NOAEL: é a abreviatura de nível de efeito adverso não-observado. Este é o nível de dose mais elevado, no qual não se observam resultados adversos relacionados com o tratamento devido ao tratamento.

Oestrogenicidade: é a capacidade de uma substância química agir como um hormônio estrogênico natural (por exemplo, estradiol 17ß) em um mamífero.

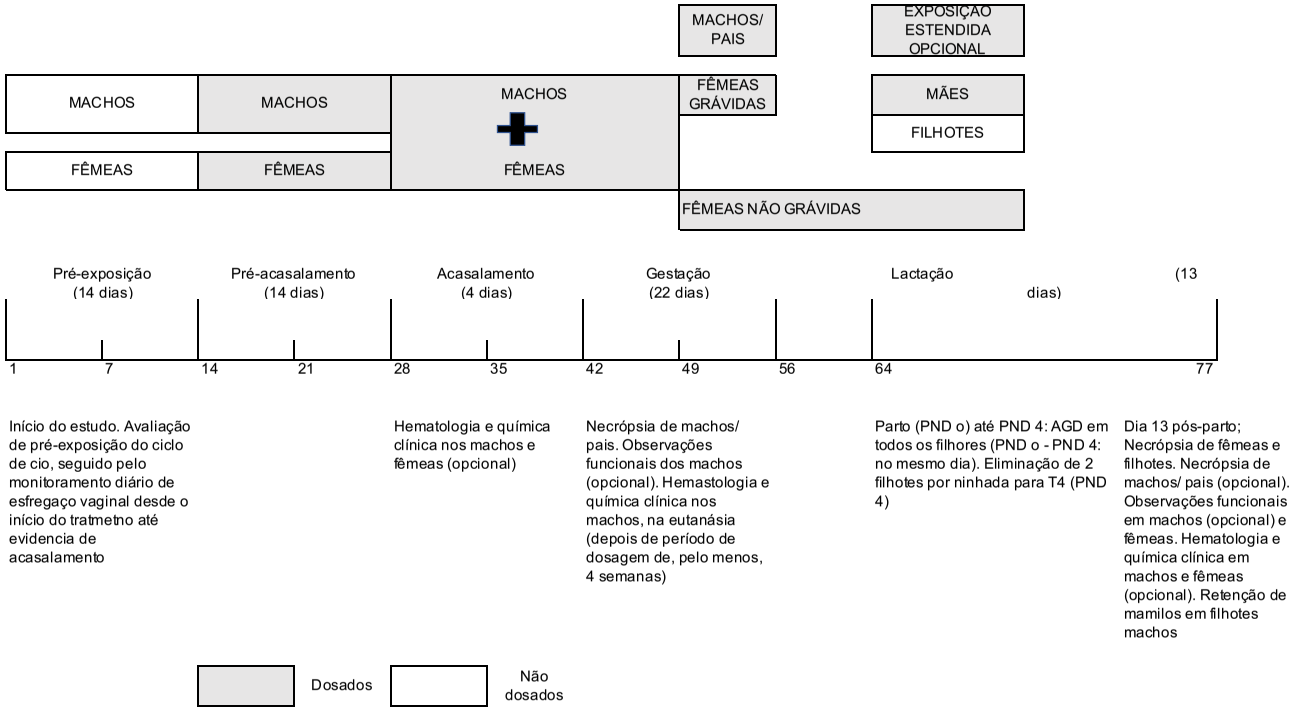
Toxicidade reprodutiva: representa efeitos prejudiciais sobre a progênie e/ou um comprometimento das funções ou capacidade reprodutiva masculina e feminina.

Atividade da tiroide: é a capacidade de uma substância química atuar como um hormônio natural da tiroide (por exemplo, T3) num mamífero.

Validação: é um processo científico projetado para caracterizar os requisitos e limitações operacionais de um método de teste e para demonstrar sua confiabilidade e relevância para uma finalidade específica.

ANEXO 2:

Diagrama do cronograma experimental, indicando a duração máxima do estudo, baseado em um período completo de 14 dias



ANEXO 3

Relatório resumo tabular dos efeitos sobre reprodução/ desenvolvimento

OBSERVAÇÕES	VALORES				
Dosagem (unidades) …	o (controle)	***	***	***	***
Pares no início (N)					
Ciclo de cio (pelo menos, duração média e frequência de ciclos irregulares)					
Fêmeas mostrando evidência de cópula (N)					
Fêmeas atingindo gravidez (N)					
wDias de concepção 1 - 5 (N)					
Dias de concepção 6 -. . [12] (N)					
Gravidez≤ 21 dias (N)					
Gravidez = 22 dias (N)					
Gravidez ≥ 23 dias (N)					
Mães com jovens nascidos vivos (N)					
Mães com jovens vivos no dia 4 pp (N)					
Implantes / mães (média)					
Filhotes vivos / mãe ao nascer (média)					
Filhotes vivos / mãe no dia 4 (média)					
Taxa de sexo no nascimento (média)					
Taxa de sexo no dia 4 (média)					
Peso da ninhada ao nascer (média)					
Peso da ninhada no dia 4 (média)					
Peso do filhote ao nascer (média)					
Peso do filhote no momento da medição da AGD (média dos machos, média das fêmeas)					
AGD do filhote no mesmo dia pós-natal, dia de nascimento 4 (machos médios, fêmeas médias, nota PND)					
Peso do filhote no dia 4 (média)					
Peso do filhote no dia 13 (média)					
Retenção mamilar do filhote macho no dia 13 (média)					
FILHOTES ANORMAIS					
Mães com 0					
Mães com 1					
Mães com > 2					
PERDA DE CRIA					
Pré-natal (implantes menos nascimentos vivos)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					
Pós-natal (nascidos vivos menos vivos no dia 13 pós-natal)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					
(1) Último dia do período de acasalamento					

Os testes aqui publicados foram traduzidos dos originais em inglês sob os títulos: A) *#430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER); B) #431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method; C) #435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion; D) #439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method; E) #437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage; F) #438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage; G) #460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants; H) #432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test; I) #428: Skin Absorption: In Vitro Method; J) #442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA; K) #442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA; L) #420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure; M) #423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method; N) #425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure; O) #129: Guidance Document On Using Cytotoxicity Tests To Estimate Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity Tests; P) #487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test; Q) #429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay; R) #492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage; S) #442C: In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA); T) #442D: In Vitro Skin Sensitization: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method; U) #491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage; V) #421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test; W) #422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test.*



Lauro Domingos Moretto

Lauro D. Moretto – Farmacêutico-Bioquímico, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Mestre em Tecnologia Químico-Farmacêutica e Doutor em Ciências dos Alimentos, também pela FCF-USP.

Atuou como docente na referida faculdade no período de 1964 a 2008, nas disciplinas Química Analítica Quantitativa, Tecnologia Químico-Farmacêutica e Supervisão da Produção. Desenvolveu atividades profissionais em cargos técnicos e de direção de 1961 a 1992 em indústrias farmacêuticas: Johnson & Johnson do Brasil, Instituto de Angeli do Brasil e Boehringer Ingelheim Brasil. Foi Vice-Presidente Executivo do Sindusfarma – Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos no Estado de São Paulo no período de 1992 a 2014. É autor/coautor de mais de 60 livros e dezenas artigos científicos e de divulgação sobre assuntos de gestão e de temas da regulamentação sanitária. Representou o setor industrial farmacêutico na CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança do Ministério da Ciência e Tecnologia, foi Conselheiro do CNS – Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e do CONCEA – Conselho Nacional do Controle da Experimentação Animal do Ministério de Ciência e Tecnologia. Atuou como membro da Comissão Permanente da Farmacopeia Brasileira da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.

Atualmente é membro do Conselho Deliberativo da Farmacopeia Brasileira da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde e conselheiro do CONCEA, conselheiro do CONIC – Conselho de Inovação e Competitividade da FIESP. É Acadêmico correspondente estrangeiro da Academia de Ciências Farmacêuticas do Paraguai, da Academia Ibero Americana de Farmácia de Granada e da Real Academia Nacional de Farmácia de Madri.

É consultor do Sindusfarma para assuntos regulatórios, educacionais e institucionais, Presidente Emérito e 1º Vice-Presidente da Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil/Academia Nacional de Farmácia, da qual é Membro Titular da Cadeira nº 4.



Marco Antonio Stephano

Médico Veterinário, graduado pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, aperfeiçoamento em Biossegurança pela Fundação Instituto Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), Especialista em Imunologia pela Organização Mundial de Saúde, Mestre em Farmacologia pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas, Doutor em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Trabalhou por 20 anos, como Pesquisador Científico, em pesquisa e produção de vacinas e biofármacos no Instituto Butantan, onde exerceu o cargo de Diretor de Garantia de Qualidade no período de 2004 a 2007. Atualmente é, como professor na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, responsável pelo Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Membro Titular da Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil / Academia Nacional de Farmácia ocupando a cadeira nº 17. Conselheiro Titular representante das indústrias Farmacêuticas entre 2014 e 2018 junto ao CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Coordenador da Câmara Permanente de Métodos Alternativos do CONCEA 2017-2018 Assessor ad hoc da FAPESP desde 2009, FINEP em 2012 e CNPq 2016. Membro do Comitê Técnico Temático de Produtos Biológicos da Farmacopeia Brasileira junto à ANVISA, membro do Committee Board on Global Health, Institute of Medicine da National Academies of Science, Washington, DC, EUA em 2012 e 2013.

ABDI
Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial