

PARTE B: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE E DE OUTROS EFEITOS NA SAÚDE

INTRODUÇÃO GERAL: PARTE B

A. NOTA EXPLICATIVA

Considerando que a adaptação ao progresso técnico do presente anexo é necessária;

B.15. Mutação génica - *Saccharomyces cerevisiae*

B.16. Recombinação mitótica - *Saccharomyces cerevisiae*

B.17. Células de mamífero in vitro - ensaio de mutação génica

B.18. Lesão e reparação do ADN - síntese não programada - células de mamífero in vitro

B.19. Ensaio in vitro de troca entre cromatídeos irmãos

B.20. Ensaio de letalidade recessiva ligada ao sexo na *Drosophila melanogaster*

B.21. Ensaio de transformação de células de mamífero in vitro

B.22. Ensaio de letalidade dominante no roedor

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

B.24. Ensaio das malhas (spot-test) no ratinho

B.25. Translocação hereditária no ratinho

B.26. Toxicidade oral subcrónica - ensaio de noventa dias em roedores (dose oral repetida)

B.27. Toxicidade oral subcrónica - ensaio de noventa dias em não-roedores (dose oral repetida)

B.28. Toxicidade dérmica subcrónica - ensaio de noventa dias em roedores

B.29. Toxicidade subcrónica por inalação - ensaio de noventa dias em roedores

B.30. Ensaio de toxicidade crónica

B.31. Ensaio de teratogénese - roedores e não-roedores

B.32. Ensaio de carcinogénese

B.33. Ensaio combinado de toxicidade crónica/carcinogénese

B.34. Ensaio de toxicidade na reprodução numa geração

B.35. Ensaio de toxicidade na reprodução em duas gerações

B.36. Toxicocinética

B. DEFINIÇÕES GERAIS DOS TERMOS UTILIZADOS NOS MÉTODOS DE ENSAIO INCLUÍDOS NO PRESENTE ANEXO

i) Toxicidade aguda: efeitos nocivos que se manifestam num determinado período (geralmente 14 dias) após a administração de uma dose única de uma determinada substância.

ii) Toxicidade evidente: termo geral que descreve os sinais de toxicidade subsequentes à administração de uma substância. Os sinais em causa devem ser suficientes para a avaliação dos riscos e devem ser tais que um aumento da dose administrada possa resultar no surgimento de sinais de toxicidade aguda e morte provável.

iii) Dose: quantidade de substância administrada. A dose é expressa em massa (gramas ou miligramas), em massa de substância ensaiada por unidade de massa do animal em estudo (por exemplo, miligramas por quilograma de massa corporal) ou ainda em concentração alimentar constante (partes por milhão ou miligramas por quilograma de alimento).

iv) Dose discriminante: a maior das quatro doses fixas que pode ser administrada sem causar mortalidade (incluindo o abate por intervenção humana) associada ao composto.

v) Dosagem: termo geral que abrange a dose administrada, bem como a respectiva frequência e duração.

vi) DL50 (dose letal média): dose única estatisticamente responsável pela morte de 50 % dos animais a que foi administrada. O valor de DL50 é expresso em massa da substância testada por unidade de massa do animal em causa (miligramas por quilograma).

vii) CL50 (concentração letal mediana): concentração de uma substância estatisticamente responsável, durante a exposição ou num determinado período após a exposição, pela morte de 50 % dos animais a ela expostos durante um determinado período. O valor de CL50 é expresso em massa da substância testada por volume-padrão de ar (miligramas por quilograma).

- viii) NOAEL: abreviatura de "no observed adverse effect level" ("dose sem efeitos adversos observados"), que consiste na dose máxima ou no nível de exposição máximo que não produz efeitos adversos detectáveis no ensaio atribuíveis ao mesmo.
- ix) Dose repetida/toxicidade subcrónica: inclui os efeitos adversos observados nos animais de laboratório como resultado da administração diária de uma determinada substância ou da exposição à mesma por um período curto relativamente à esperança de vida dos mesmos.
- x) Dose máxima tolerável (DMT): dose máxima que produz sinais de toxicidade nos animais sem alterar de modo significativo a sobrevivência dos mesmos ao ensaio em que é utilizada.
- xi) Irritação cutânea: produção de alterações inflamatórias na pele na sequência da aplicação de uma determinada substância.
- xii) Irritação ocular: produção de alterações oculares na sequência da aplicação de uma determinada substância na superfície anterior do olho.
- xiii) Sensibilização cutânea (dermatite de contacto alérgica): reacção cutânea, de origem imunológica, a uma determinada substância.
- xiv) Corrosão cutânea: produção de lesões cutâneas irreversíveis na sequência da aplicação de uma determinada substância por um período compreendido entre 3 minutos e 4 horas.
- xv) Toxicocinética: estudo da absorção, distribuição, metabolismo e excreção das substâncias ensaiadas.
- xvi) Absorção: processo(s) pelo(s) qual(is) uma determinada substância penetra no organismo.
- xvii) Excreção: processo(s) pelo(s) qual(is) uma determinada substância e/ou os seus metabolitos são removidos do organismo.
- xviii) Distribuição: processo(s) pelo(s) qual(is) uma substância absorvida e/ou os seus metabolitos se repartem pelo organismo.
- xix) Metabolismo: processo(s) pelo(s) qual(is) as substâncias administradas são transformadas estruturalmente no organismo, através de reacções enzimáticas e não-enzimáticas.

B.I Toxicidade aguda, toxicidade subcrónica ou pelo método da dose repetida e toxicidade crónica

A toxicidade aguda de uma substância, bem como os respectivos efeitos tóxicos sobre um órgão ou sistema, podem avaliar-se por recurso a diversos ensaios toxicológicos (métodos B.1-B.5), com base nos quais, através de uma dose única, é possível obter uma primeira indicação da toxicidade.

Em função da toxicidade de uma substância, pode optar-se por um ensaio-limite na determinação completa de DL50, embora, no caso dos estudos de inalação, não se preveja qualquer ensaio-limite, na medida em que não foi possível definir um valor-limite único de exposição por inalação.

Deve recorrer-se a métodos que utilizem o número mínimo possível de animais e minimizem o respectivo sofrimento, nomeadamente o método da dose fixa (B.1 bis) e o método da classe de toxicidade aguda (B.1 tris). No que respeita aos ensaios de nível 1, a realização de um estudo com outra espécie poderá complementar as conclusões obtidas no primeiro ensaio. Neste caso, pode utilizar-se um método de ensaio normalizado ou, como alternativa, adaptar o método a um número mais reduzido de animais.

O ensaio de toxicidade por dose repetida (métodos B.7, B.8 e B.9) inclui a avaliação dos efeitos tóxicos resultantes da exposição repetida. Deve salientar-se a necessidade de efectuar uma observação clínica pormenorizada dos animais, de modo a obter o máximo possível de informações. Tais ensaios devem permitir identificar os órgãos-alvo da toxicidade bem como as doses tóxicas e não-tóxicas. Poderá ser necessário proceder a uma investigação mais aprofundada dos aspectos em causa recorrendo a estudos de longo prazo (métodos B.26-B.30 e B.33).

B.II Mutagenicidade - Genotoxicidade

A mutagenicidade refere-se à indução de alterações permanentes e transmissíveis na quantidade ou na estrutura do material genético das células ou organismos. Estas alterações ("mutações")

podem abranger um único gene ou segmentos de um gene, um conjunto de genes ou cromossomas completos. Os efeitos sobre os cromossomas completos podem ser estruturais ou numéricos.

A actividade mutagénica de uma substância é avaliada por intermédio de ensaios in vitro para a detecção de mutações génicas pontuais em bactérias (método B.13/14) e/ou aberrações cromossómicas estruturais em células de mamíferos (método B.10).

São também aceitáveis métodos in vivo como, por exemplo, o teste do micronúcleo (método B.12) e a análise de células de medula óssea em metafase (método B.11). Todavia, na ausência de contra-indicações, são largamente preferíveis os métodos in vitro.

No caso de volumes de produção mais elevados e/ou com o objectivo de realizar ou confirmar uma avaliação dos riscos, podem ser necessários estudos complementares de avaliação da mutagenicidade ou pré-despistagem da carcinogenicidade, que podem utilizar-se com diversos fins, nomeadamente a confirmação dos resultados obtidos nos ensaios de base, a investigação de parâmetros não abordados nos mesmos e o início ou prosseguimento de estudos in vivo.

Para os fins em causa, os métodos B.15 a B.25 utilizam sistemas eucariotas in vitro e in vivo, abrangendo uma vasta gama de parâmetros biológicos. Os referidos métodos fornecem dados relativos a mutações pontuais e outros parâmetros em organismos mais complexos que as bactérias utilizadas nos ensaios de base.

Como regra geral, sempre que se preveja a realização de uma série de ensaios complementares de mutagenicidade, os mesmos devem ser concebidos de modo a facultar a obtenção de informações adicionais importantes sobre o potencial mutagénico e/ou carcinogénico da substância em causa.

A selecção dos estudos adequados a uma finalidade específica depende de numerosos factores, nomeadamente as características físico-químicas da substância em causa, os resultados dos ensaios bacteriológicos e citogenéticos anteriores, o perfil metabólico da substância, os resultados de outros estudos de toxicidade efectuados e as utilizações conhecidas da substância. Assim, em virtude da diversidade de factores a ter em conta, não se afigura adequado adoptar um esquema rígido de selecção dos ensaios.

A Directiva 93/67/CEE estabelece alguns princípios gerais a adoptar na selecção dos ensaios; por seu turno, o documento de orientação técnica relativo à avaliação dos riscos inclui estratégias de ensaio pormenorizadas que são, contudo, flexíveis, podendo adaptar-se de acordo com as circunstâncias.

Todavia, apresentam-se de seguida diversos métodos de investigação complementar, em função do parâmetro genético a que se referem:

Estudos para a investigação de mutações génicas pontuais

- a) Estudo de mutações directas ou reversas com microrganismos eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae*) (método B.15).
- b) Estudo in vitro de mutações directas em células de mamífero (método B.17).
- c) Ensaio de letalidade recessiva ligada ao sexo na *Drosophila melanogaster* (método B.20).
- d) Ensaio de mutações em células somáticas in vivo (ensaio das malhas no ratinho) (método B.24).

Estudos para a investigação de aberrações cromossómicas

- a) Estudos citogenéticos in vivo com mamíferos; deve proceder-se à análise de células de medula óssea em metafase caso a mesma não tenha sido efectuada na avaliação inicial (método B.11). Além disso, pode investigar-se a citogenética de células germinativas in vivo (método B.23).
- b) Estudos citogenéticos in vivo com células de mamíferos, caso não tenham sido efectuados na avaliação inicial (método B.10).
- c) Ensaios de letalidade dominante em roedores (método B.22).
- d) Ensaio de translocação hereditária no ratinho (método B.25).

Efeitos genotóxicos - efeitos no ADN

A genotoxicidade, definida como o conjunto dos efeitos potencialmente nocivos para o material

genético não necessariamente associados à mutagenicidade, pode ser indicada pelo surgimento de lesões no ADN sem provas directas da existência de mutações. Os métodos que se seguem, que utilizam microrganismos eucariotas ou células de mamíferos, podem ser adequados à investigação dos aspectos em causa:

a) Recombinação mitótica em *Saccharomyces cerevisiae* (método B.16).

b) Lesão e reparação do ADN - síntese de ADN não programada - células de mamífero - in vitro (método B.18).

c) Intercâmbio de cromatídeos irmãos em células de mamífero - in vivo (método B.19).

Métodos alternativos de investigação do potencial carcinogénico

Existem ensaios de transformação de células de mamífero para a determinação da capacidade de uma substância de induzir alterações de morfologia e comportamento em culturas celulares, que se consideram associados a transformações malignas in vivo (método B.21). Podem utilizar-se diferentes tipos de células e diversos critérios de transformação.

Avaliação do risco de efeitos hereditários em mamíferos

Existem métodos de determinação dos efeitos hereditários determinados por mutações génicas pontuais em mamíferos completos, nomeadamente o ensaio do locus específico no ratinho, bem como métodos de determinação de mutações em células germinativas na primeira geração (não incluídas no presente anexo) e métodos de detecção de aberrações cromossómicas, nomeadamente o ensaio de translocação hereditária no ratinho (método B.25). Estes métodos podem utilizar-se para a avaliação dos possíveis riscos genéticos de uma determinada substância para o homem. Todavia, em virtude da complexidade dos referidos ensaios e do número bastante elevado de animais necessários, em especial no que respeita ao ensaio do locus específico, a realização dos mesmos deve ser devidamente fundamentada.

B.III Biocarcinogenicidade

As substâncias químicas podem classificar-se de carcinogénicas genotóxicas ou não-genotóxicas, de acordo com o mecanismo de acção presumível.

É possível obter dados de pré-despistagem relativos ao potencial carcinogénico de uma substância com base em estudos de mutagenicidade/genotoxicidade. Os ensaios de toxicidade por administração repetida e de toxicidade subcrónica ou crónica permitem obter informações adicionais. O ensaio de toxicidade da dose repetida (método B.7) e os estudos de administração repetida a mais longo prazo incluem a avaliação das alterações histopatológicas observadas nos ensaios de toxicidade da dose repetida, nomeadamente a hiperplasia de determinados tecidos. Estes estudos, juntamente com os dados toxicocinéticos, contribuem para a identificação de substâncias químicas com potencial carcinogénico, podendo, para tal, ser necessário efectuar estudos mais aprofundados, nomeadamente um ensaio de carcinogenicidade (método B.32) ou, em muitos casos, um estudo combinado de carcinogenicidade e toxicidade crónica (método B.33).

B.IV Toxicidade na reprodução

A toxicidade na reprodução pode detectar-se de diversas formas, nomeadamente através do enfraquecimento das funções ou da capacidade reprodutoras masculina e feminina, que se designa "efeitos na fertilidade", ou da indução de efeitos nocivos não transmissíveis à progenitura, designada "toxicidade no desenvolvimento", que inclui a teratogenicidade e os efeitos durante a lactação.

No que respeita aos estudos de carcinogenicidade, que fazem parte dos ensaios de toxicidade no desenvolvimento, o método B.31 baseia-se na administração por via oral. Em função das propriedades físicas da substância em causa ou da via provável de exposição humana, podem utilizar-se formas de administração alternativas. Em tais casos, deve adaptar-se o método de ensaio, tendo em conta os elementos adequados dos métodos de 28 dias.

Sempre que se afigure necessário realizar um ensaio de reprodução (fertilidade) em três gerações, pode utilizar-se o método descrito para o ensaio da reprodução em duas gerações (método B.35), aplicando-o à terceira geração.

B.V Neurotoxicidade

A neurotoxicidade pode detectar-se de diversas formas, nomeadamente através de alterações funcionais e/ou estruturais e bioquímicas no sistema nervoso central ou periférico. Os ensaios de toxicidade aguda permitem obter uma primeira indicação da neurotoxicidade. O ensaio de toxicidade da dose repetida (método B.7) inclui a avaliação dos efeitos neurotoxicológicos, devendo efectuar-se um exame clínico dos animais tão completo quanto possível, de modo a obter o máximo de informações. O método deve contribuir para identificar substâncias químicas com potencial neurotóxico, podendo, para tal, ser necessário efectuar um estudo mais aprofundado. Além disso, deve pesquisar-se o potencial das substâncias de produzir efeitos neurotóxicos específicos não detectáveis em outros estudos de toxicidade. Verificou-se, por exemplo, que algumas substâncias organofosforadas apresentam uma actividade retardada, que pode avaliar-se por recurso aos métodos B.37 e B.38, mediante exposição única ou dose repetida.

B.VI Imunotoxicidade

A imunotoxicidade pode detectar-se de diversas formas, nomeadamente através da imunossupressão e/ou do reforço da resposta do sistema imunológico, determinando uma hipersensibilidade ou uma auto-imunidade induzida. O ensaio de toxicidade da dose repetida (método B.7) inclui a avaliação dos efeitos imunotoxicológicos. O método deve contribuir para identificar substâncias químicas com potencial imunotóxico, podendo, para tal, ser necessário efectuar um estudo mais aprofundado.

B.VII Toxicocinética

Os estudos toxicocinéticos contribuem para a interpretação e avaliação dos dados de toxicidade, tendo por objectivo elucidar determinados aspectos da toxicidade das substâncias em causa; os respectivos resultados podem utilizar-se na concepção de outros estudos de toxicidade. Não pretende determinar-se a totalidade dos parâmetros em cada caso; a realização da sequência completa de estudos toxicocinéticos (absorção, excreção, distribuição e metabolismo) apenas é necessária em algumas situações. No que respeita a determinadas substâncias, poderá ser oportuno alterar a referida sequência, podendo também bastar a realização de um estudo de dose única (método B.36).

As informações relativas à estrutura química (SAR) e às propriedades físico-químicas podem também fornecer indicações sobre as características de absorção pela via de administração prevista, bem como sobre as possibilidades de metabolização e distribuição pelos tecidos. Os estudos de toxicidade e toxicocinética efectuados anteriormente podem também fornecer informações relativas aos parâmetros toxicocinéticos.

C. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Antes de iniciar qualquer estudo de toxicidade devem conhecer-se a composição da substância em estudo, incluindo as principais impurezas que contenha, e as propriedades físico-químicas mais importantes, nomeadamente a estabilidade.

As propriedades físico-químicas da substância fornecem informações de relevo para a escolha da via de administração e a concepção de cada estudo específico, bem como para o manuseamento e a armazenagem da substância.

O estudo deve ser precedido do desenvolvimento de um método analítico para a determinação qualitativa e quantitativa da substância em estudo (incluindo, sempre que possível, as principais impurezas) no meio de administração e no material biológico.

Devem incluir-se no relatório de ensaio todas as informações disponíveis referentes à identificação, às propriedades físico-químicas, à pureza e ao comportamento da substância em estudo.

D. CUIDADOS COM OS ANIMAIS

Nos estudos de toxicidade é fundamental efectuar um controlo restrito das condições ambientais e utilizar técnicas adequadas para o cuidado dos animais.

i) Condições de alojamento

As condições ambientais nos locais ou recintos destinados aos animais devem ser adequadas às

espécies em estudo. Para ratos, ratinhos e cobaias, a temperatura do local deve ser de $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ e a humidade relativa de 30 % a 70 %; no que respeita aos coelhos, a temperatura ambiente deve ser de $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ e a humidade relativa de 30 % a 70 %.

Algumas técnicas experimentais são particularmente sensíveis aos efeitos da temperatura; em tais casos, a descrição do método de ensaio deve incluir pormenores relativos às condições adequadas. Em todos os ensaios de toxicidade, a temperatura e humidade devem ser controladas, registadas e referidas no relatório final.

A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Os pormenores relativos à iluminação devem ser registados e incluídos no relatório final.

Salvo especificação em contrário, os animais devem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. Em caso de alojamento colectivo, não devem colocar-se mais de 5 animais numa gaiola.

Nos relatórios de experiências com animais, é conveniente indicar o tipo de gaiolas utilizadas e o número de animais alojados em cada gaiola, tanto durante o período de exposição à substância em estudo como durante o eventual período de observação subsequente.

ii) Condições de alimentação

A dieta deve satisfazer todos os requisitos nutricionais da espécie em estudo. No caso de as substâncias serem administradas aos animais na respectiva dieta, o valor nutricional da mesma pode ser reduzido pela interacção entre a substância e determinados constituintes da dieta. Essa possibilidade deve ser tida em conta na interpretação dos resultados dos ensaios. Podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório, com um fornecimento ilimitado de água para beber. A escolha da dieta pode ser condicionada pela necessidade de assegurar a administração adequada da substância em estudo, caso se recorra a esta via.

Os eventuais contaminantes que influenciem a toxicidade não devem estar presentes em concentrações que possam interferir com os resultados.

E. BEM-ESTAR DOS ANIMAIS

O bem-estar dos animais deve ser tido em conta na elaboração dos métodos de ensaio.

Apresentam-se de seguida algumas sugestões nesta matéria, que não são exaustivas. Os procedimentos e/ou condições pormenorizados figuram no texto dos diversos métodos.

- Para a determinação da toxicidade oral aguda podem utilizar-se dois métodos alternativos, designadamente o "método da dose fixa" e o "método da classe de toxicidade aguda". O "método da dose fixa" não utiliza a morte como critério específico e necessita de um número mais reduzido de animais. O "método da classe de toxicidade aguda" utiliza um número de animais inferior em cerca de 70 % ao utilizado no método B.1 para a determinação da toxicidade oral aguda. Qualquer dos métodos alternativos provoca menos dor e um menor sofrimento que os métodos clássicos.

- O número de animais utilizados é reduzido ao mínimo cientificamente aceitável: nos métodos B.1 e B.3 apenas se utilizam, por dose, 5 animais do mesmo sexo; no caso da determinação da sensibilização cutânea no ensaio de maximização em porquinhos da Índia (método B.6) apenas se utilizam 10 animais (5 no que respeita ao lote de controlo negativo); por seu turno, o número de animais necessário ao controlo positivo nos ensaios de mutagenicidade in vivo (métodos B.11 e B.12) é também reduzido.

- A dor e o sofrimento dos animais no decurso dos ensaios são minimizados: os animais que mostrem sinais intensos e persistentes de dor e sofrimento poderão ser sacrificados por intervenção humana; por outro lado, não devem administrar-se substâncias de um modo que provoquem dor e sofrimento acentuados em virtude das propriedades corrosivas ou irritantes das mesmas (métodos B.1, B.2 e B.3).

- A introdução de ensaios-limite permite evitar a utilização de doses desnecessariamente elevadas, não apenas nos ensaios de toxicidade aguda (métodos B.1, B.2 e B.3) mas também nos ensaios de mutagenicidade in vivo (métodos B.11 e B.12).

- A nova estratégia utilizada na avaliação das propriedades irritantes permite não realizar determinados ensaios ou limitá-los a um único animal, nos casos em que tal facto permita obter dados científicos suficientes.

Os referidos dados científicos podem basear-se nas propriedades físico-químicas da substância em estudo, nos resultados de outros ensaios realizados ou nos resultados de ensaios *in vitro* devidamente validados. Por exemplo, no caso de um ensaio de toxicidade aguda por via cutânea com exposição à dose-limite não provocar irritação cutânea, poderá não ser necessário realizar outros ensaios (método B.4); por motivos análogos, as substâncias que tenham manifestado uma capacidade corrosiva evidente ou causado uma grave irritação cutânea num ensaio de irritação cutânea (método B.4) não devem ser utilizadas em ensaios de irritação ocular (método B.5).

F. ENSAIOS ALTERNATIVOS

Um dos objectivos científicos da União Europeia consiste na elaboração e validação de técnicas alternativas que forneçam a mesma quantidade de informações utilizando um número inferior de animais, causando menor sofrimento ou evitando o recurso aos mesmos.

Na caracterização dos riscos e consequente classificação e rotulagem dos produtos devem utilizar-se, sempre que possível, métodos deste tipo, à medida que se encontrem disponíveis.

G. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Aquando da avaliação e interpretação dos ensaios devem ter-se em conta as limitações apresentadas pela extrapolação directa para o homem dos resultados obtidos em estudos com animais e *in vitro*, pelo que, para a confirmação dos referidos resultados, devem utilizar-se, sempre que se encontrem disponíveis, dados referentes a efeitos adversos no homem.

Pode utilizar-se os referidos resultados na classificação e rotulagem das substâncias químicas novas e existentes nos seus efeitos para a saúde humana, as quais têm por base as propriedades intrínsecas das mesmas, identificadas e quantificadas pelos métodos em causa. Os critérios correspondentes de classificação e rotulagem que figuram no anexo VI fazem também referência aos parâmetros dos protocolos incluídos nos referidos métodos de ensaio.

Os resultados podem ainda ser utilizados em estudos de avaliação dos riscos apresentados por substâncias químicas novas e existentes; nos respectivos documentos de orientação indicam-se as estratégias de ensaio adequadas para os fins em causa.

H. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A maioria dos métodos apresentados foram elaborados no âmbito do programa da OCDE das directrizes em matéria de ensaios, devendo os mesmos ser executados em conformidade com as boas práticas de laboratório, de modo a garantir, na medida do possível, o reconhecimento mútuo dos resultados.

Podem obter-se informações adicionais nas referências incluídas nas directrizes da OCDE, bem como em outras publicações no domínio em causa.

B. 1 tris

TOXICIDADE ORAL AGUDA — MÉTODO DA CLASSE DE TOXICIDADE AGUDA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O método da classe de toxicidade aguda fornece informações para a avaliação e a classificação dos riscos.

O método utiliza três doses fixas separadas de modo adequado, com vista a permitir a classificação de um composto com base nos resultados obtidos. Além disso, o procedimento descrito no presente método de ensaio permite a selecção de três doses fixas adicionais, que podem ser utilizadas como opções em determinadas fases decisivas ou para a realização de ensaios posteriores, caso se pretendam ou necessitem esclarecimentos complementares.

O método utiliza doses de partida definidas, não tendo por objectivo a determinação de um valor de DL_{50} preciso, mas antes de uma gama de exposição susceptível de induzir a morte, uma vez que a morte de um determinado número de animais constitui o principal critério de avaliação. Os resultados do ensaio devem permitir uma classificação de acordo com os critérios referidos no anexo VI. Em virtude da natureza sequencial da abordagem, a duração do ensaio poderá exceder a duração do método descrito em B.1. A principal vantagem do presente método reside no facto de utilizar um número de animais mais reduzido que o método para a determinação da toxicidade oral aguda (B.1) e o método alternativo para a determinação da dose fixa (B.1 *bis*).

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. Definições

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.3. Princípio do método de ensaio

A substância é administrada por via oral a um lote de animais, numa das doses definidas. O ensaio é efectuado por fases, em cada uma das quais se utilizam três animais do mesmo sexo. Não é necessário efectuar uma observação prévia. A ausência ou presença de mortalidade dos animais devida à substância determina a fase seguinte do processo, ou seja:

- Não é necessário prosseguir o ensaio
- A fase seguinte utiliza a mesma dose com animais do sexo oposto
- A fase seguinte utiliza a dose imediatamente superior ou inferior.

1.4. Descrição do método de ensaio

1.4.1. Preparação

Seleccionam-se de modo aleatório animais adultos jovens e saudáveis, que se marcam para permitir a identificação individual; os animais são mantidos nas gaiolas durante pelo menos 5 dias antes do início do ensaio, tendo em vista a adaptação às condições laboratoriais. Os animais podem ser agrupados por sexo e dose; todavia, o número de animais em cada gaiola não deve prejudicar a observação adequada de cada animal.

A substância em estudo é administrada aos animais numa única dose, por intermédio de uma sonda gástrica ou de uma cânula de intubação adequada.

Se necessário, a substância é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se o uso de uma solução ou suspensão aquosa ou, se tal não for possível, uma solução ou emulsão num óleo (nomeadamente óleo de milho) ou ainda uma solução noutra veículo. No caso de se utilizar um veículo não-aquoso, devem conhecer-se, ou determinar-se antes do ensaio, as respectivas características de toxicidade.

Os animais devem ser jejuados antes da administração da substância (desde a véspera, no caso do rato, e 3 a 4 horas antes, no caso do ratinho). Não deve, contudo, retirar-se a água.

1.4.2. *Condições de ensaio*

1.4.2.1. Animais de ensaio

Salvo indicação em contrário, o rato constitui a espécie roedora preferida. As fêmeas devem ser nulíparas e não-grávidas.

No início do estudo, a variação de massa dos animais deve ser mínima, não excedendo +20 % da massa média de cada sexo.

1.4.2.2. Número e sexo

Em cada etapa utilizam-se três animais do mesmo sexo. Na etapa inicial podem utilizar-se animais de qualquer sexo.

1.4.2.3. Doses

A dose de partida é seleccionada entre as três doses fixas, isto é, 25, 200 e 2 000 mg/kg de massa corporal, devendo ser a dose mais susceptível de induzir a morte de, pelo menos, alguns dos animais a que for administrada. Em função da dose de partida, pode utilizar-se um dos procedimentos que se apresentam no anexo 1 na forma de fluxogramas.

Na selecção do sexo e da dose de partida devem utilizar-se todos os dados disponíveis, nomeadamente os dados relativos à relação estrutura/actividade da substância. Caso os referidos dados permitam prever a ausência de mortalidade associada à dose mais elevada (2 000 mg/kg de massa corporal) deve efectuar-se um ensaio-limite. Nos casos em que não existam dados relativos à substância em estudo, recomenda-se, por motivos ligados ao bem-estar dos animais, a utilização de 200 mg/kg de massa corporal como dose de partida.

Ocasionalmente, poderá ser aconselhável dispor de informações mais pormenorizadas que as obtidas através da realização do ensaio com as três doses fixas de 25, 200 e 2 000 mg/kg de massa corporal, podendo então efectuar-se ensaios complementares utilizando doses fixas de 5, 50 e 500 mg/kg de massa corporal.

Não devem administrar-se doses que se saiba causarem dor ou sofrimento acentuados em virtude das propriedades corrosivas ou fortemente irritantes da substância.

O intervalo de tempo compreendido entre a realização de um estudo com dois lotes de animais é determinado pela manifestação, duração e gravidade dos sinais de toxicidade. Não deve iniciar-se um ensaio com um lote de animais do sexo oposto ou com a dose imediatamente seguinte sem que esteja assegurada a sobrevivência dos animais utilizados no ensaio anterior.

1.4.2.4. Ensaio-limite

É possível realizar um ensaio-limite com três animais de cada sexo utilizando a dose de 2 000 mg/kg de massa corporal. Caso se observe mortalidade associada à substância, poderá ser necessário efectuar um novo ensaio com a dose de 200 mg/kg de massa corporal (ou, alternativamente, 500 mg/kg).

1.4.2.5. Período de observação

Como regra geral, os animais devem ser observados durante 14 dias, excepto no caso de morrerem ou de ser necessário removê-los e abatê-los por intervenção humana. Todavia, não deve fixar-se um período específico de observação, devendo antes determinar-se o mesmo em função das reacções tóxicas, bem como do tempo decorrido até à respectiva manifestação e da duração do período de recuperação. O tempo decorrido até à manifestação e ao desaparecimento dos sinais de toxicidade possui importância, nomeadamente se existir uma tendência para o retardamento dos mesmos. Todas as observações devem ser registadas de modo sistemático, mantendo-se registos individuais para cada animal.

1.4.3. *Procedimento*

Após o período de jejum, os animais são pesados, administrando-se de seguida a substância em estudo. Os alimentos podem ser de novo retirados nas 3 ou 4 horas subsequentes. No caso de a dose ser administrada por fracções, num determinado período, poderá ser necessário fornecer aos animais alimentos e água, em função do período em causa.

O volume máximo de líquido que pode administrar-se de cada vez depende das dimensões do animal. Em roedores, o referido volume não deve, em geral, exceder 1 ml/100 g de massa corporal; todavia, no caso de soluções aquosas, admite-se um volume de 2 ml/100 g de massa corporal. As variações no volume de ensaio devem ser minimizadas mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante em todas as doses. Caso não seja possível administrar uma dose única, a mesma pode ser repartida em várias fracções num período não superior a 24 horas.

Apresentam-se no anexo 1 pormenores relativos aos procedimentos de ensaio.

1.4.3.1. Observações gerais

No dia da administração deve efectuar-se um exame clínico cuidadoso pelo menos duas vezes, podendo esta frequência ser superior em função da reacção dos animais ao ensaio; nos dias subsequentes deve efectuar-se, pelo menos, um exame clínico diário. Os animais moribundos e aqueles que mostrem sinais de dor e sofrimento intensos devem ser abatidos por intervenção humana. Os animais abatidos por intervenção humana devem ser considerados da mesma forma que os animais mortos em consequência do ensaio.

No caso dos animais abatidos por intervenção humana ou encontrados mortos, deve registar-se a hora da morte de um modo tão preciso quanto possível. Se os animais continuarem a exibir sinais de toxicidade devem efectuar-se observações complementares. Estas últimas incluem alterações na pele e no pelo, nos olhos e nas mucosas, bem como nos sistemas respiratório, circulatório, nervoso autónomo e nervoso central, além da actividade somatomotora e dos padrões de comportamento. Deve conferir-se uma atenção particular a sinais tais como tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sonolência e coma.

Todas as observações devem ser registadas de modo sistemático, mantendo-se registos individuais para cada animal.

1.4.3.2. Massa corporal

Todos os animais devem ser pesados imediatamente antes da administração da substância em estudo e, na sequência da mesma, com uma assiduidade pelo menos semanal. Devem determinar-se e registar-se todas as alterações de massa. Os animais a abater por intervenção humana devem também ser pesados no termo do ensaio.

1.4.3.3. Autópsia

Todos os animais utilizados nos ensaios, incluindo os que morrem ou são removidos durante o mesmo, devem ser autopsiados. Devem registar-se todas as alterações patológicas importantes observadas em cada animal. Pode proceder-se ao exame microscópico de órgãos que mostrem importantes sinais de patologia em animais que sobrevivam um mínimo de 24 horas.

2. DADOS

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, o número de animais encontrados mortos ou abatidos por intervenção humana, a hora da morte de cada animal, a descrição e evolução temporal dos efeitos tóxicos e respectiva reversibilidade, bem como os dados obtidos por autópsia.

No anexo II apresentam-se directrizes gerais para a interpretação dos resultados, tendo em vista a classificação das substâncias.

3. RELATÓRIO

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir, sempre que possível, as seguintes informações:

Animais utilizados no ensaio:

- espécie/estirpe;
- perfil microbiológico dos animais, sempre que conhecido;
- número, idade e sexo dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, dieta administrada, etc.;
- massa de cada animal determinada no início do ensaio, em intervalos semanais após a administração da substância e no final do ensaio.

Condições de ensaio:

- justificação da escolha de um veículo não-aquoso;
- pormenores relativos à administração da substância em estudo, nomeadamente volumes administrados e duração da dosagem;
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo e a origem dos mesmos);
- motivo da selecção da dose de partida.

Resultados:

- quadro resumido das reacções de cada animal em função do sexo e da dose administrada (animais que mostrem sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, gravidade e duração dos efeitos),
- tempo decorrido até à manifestação dos sinais de toxicidade e eventual reversibilidade dos mesmos, para cada animal;
- dados obtidos por autópsia e exame histopatológico de cada animal, se disponíveis.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

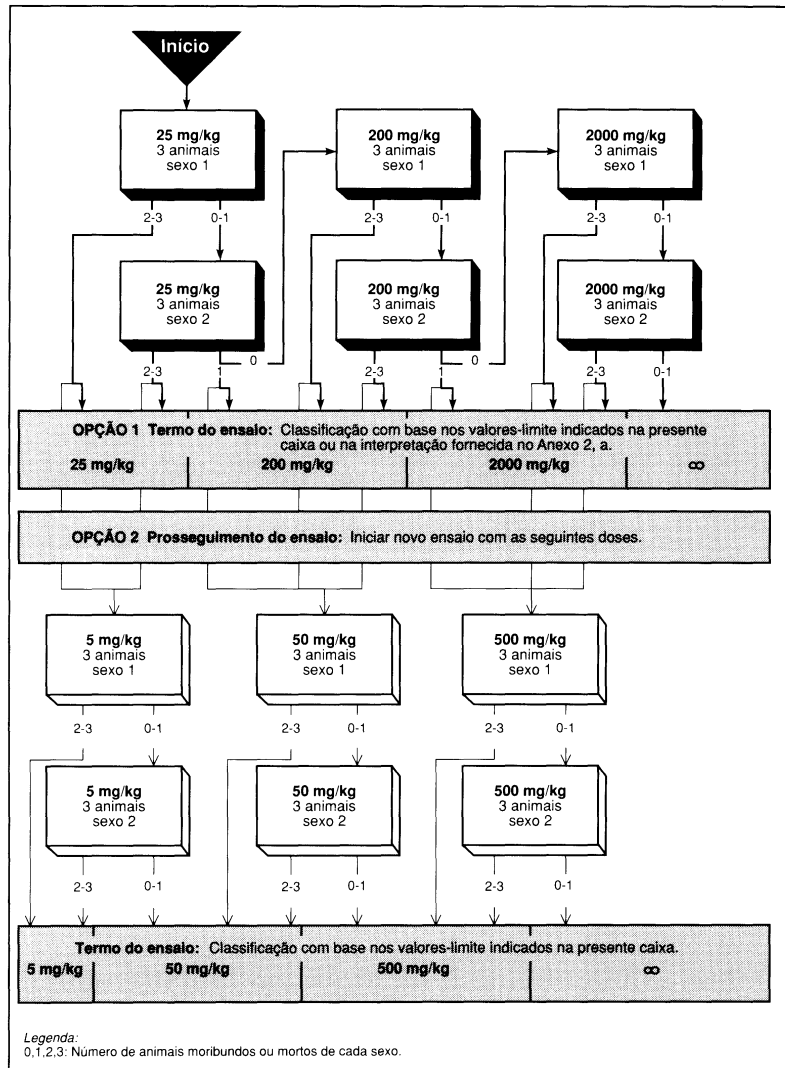
O presente método é análogo ao método OCDE TG 423.

ANEXO 1

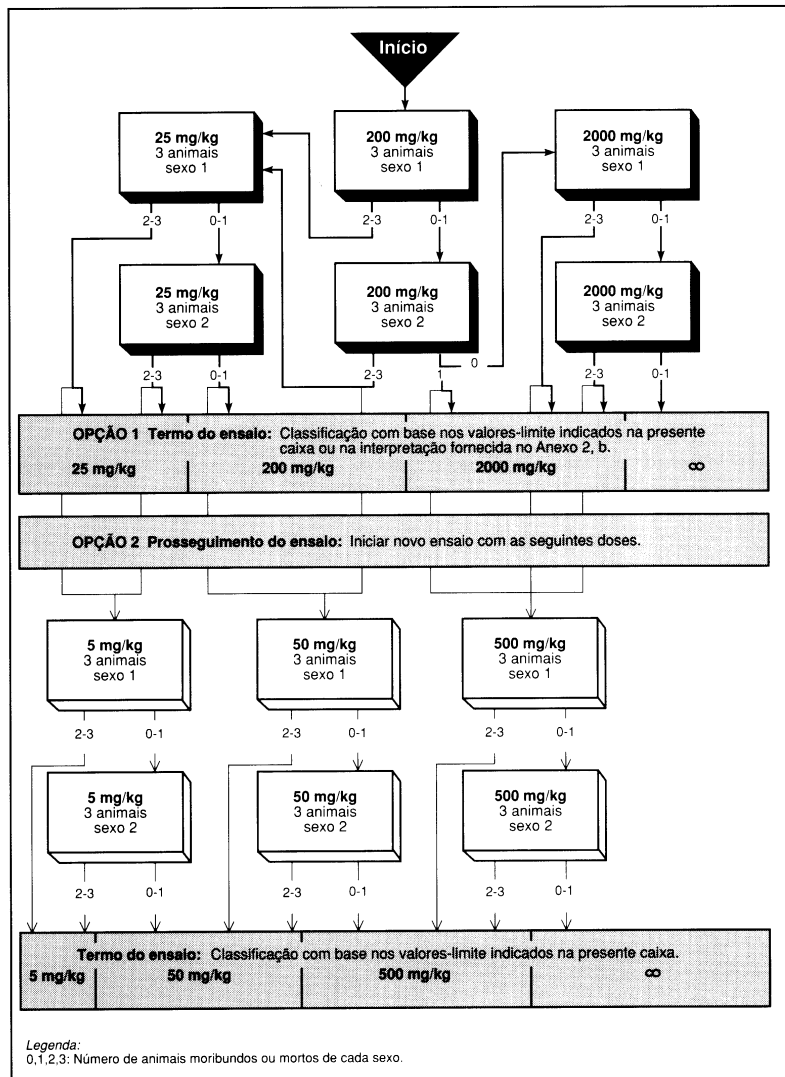
PROCEDIMENTO DE ENSAIO

1. Como referido em 1.4.2.3, a dose de partida deve provocar a morte de, pelo menos, alguns dos animais a que for administrada. As informações que podem ser utilizadas para a selecção da dose de partida incluem:
 - dados referentes às propriedades físico-químicas;
 - relação estrutura-actividade da substância;
 - quaisquer dados obtidos com base em outros ensaios de toxicidade;
 - experiência prévia de utilização da substância.
2. No que respeita a cada dose de partida, o procedimento a seguir encontra-se especificado no presente anexo na forma de fluxogramas. Em função do número de animais mortos ou abatidos por intervenção humana, o procedimento segue uma das vias indicadas nos fluxogramas.
3. No caso de a administração de uma dose de partida de 25 ou 200 mg/kg de massa corporal determinar apenas a morte de um animal do sexo utilizado no segundo ensaio, este último não deverá ser prosseguido. Se, todavia, não foram observados sinais de toxicidade nos cinco outros animais, deverá ter-se em conta, durante a autópsia, a possibilidade de a morte se dever a factores que não a substância administrada. Em tais casos, deve prosseguir-se o ensaio com a dose imediatamente superior.
4. No caso de a administração de uma dose de 2 000 mg/kg de massa corporal determinar a morte de um animal de cada sexo, é de prever que o valor de DL_{50} exceda aquele valor. Contudo, uma vez que se trata de um resultado-limite, deve observar-se atentamente a reacção dos restantes dois animais de cada sexo; a manifestação de sinais acentuados de toxicidade nestes últimos poderá levar a uma classificação que corresponda a um valor de DL_{50} igual ou inferior a 2 000 mg/kg de massa corporal ou justificar a necessidade de prosseguir o ensaio com a mesma dose.
5. O procedimento descrito permite efectuar o ensaio com três doses fixas adicionais (opção 2). Esta opção pode utilizar-se para seleccionar uma dose alternativa em determinadas fases decisivas ou para a realização de ensaios posteriores, após o termo do ensaio em causa (opção 1). Nos fluxogramas, a opção 1 é indicada por setas a cheio e a opção 2 por linhas a fino.

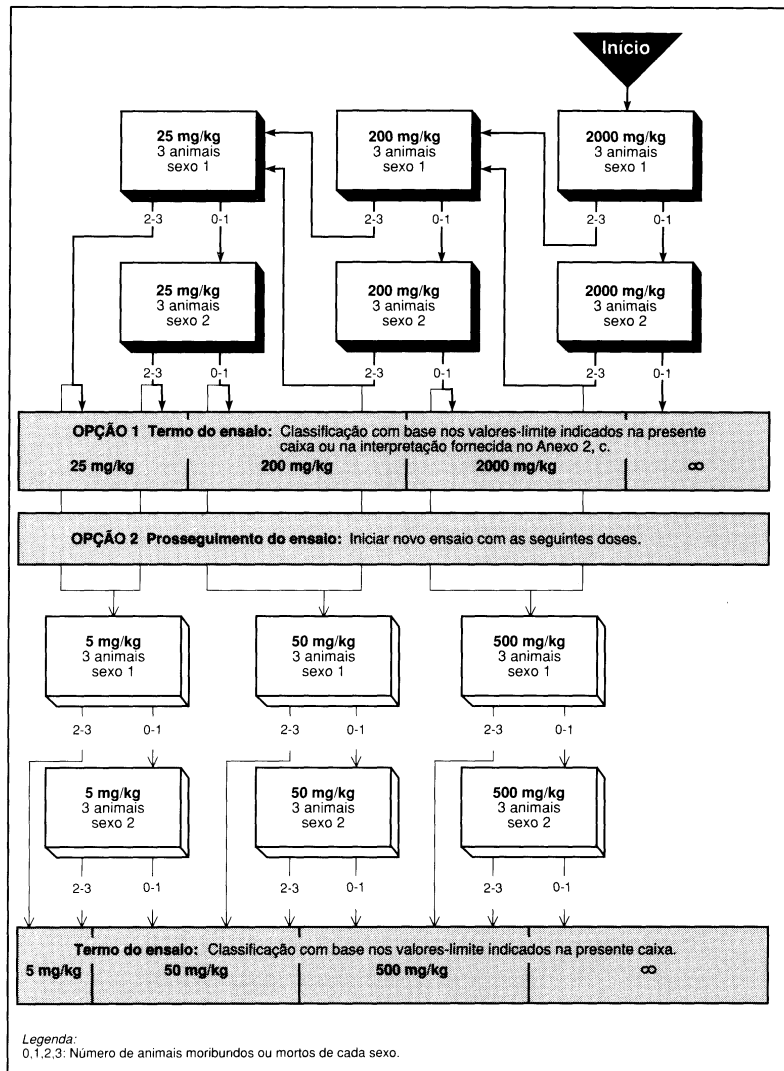
a) Procedimento de ensaio com uma dose de partida de 25 mg/kg de massa corporal



b) Procedimento de ensaio com uma dose de partida de 200 mg/kg de massa corporal



c) Procedimento de ensaio com uma dose de partida de 2 000 mg/kg de massa corporal



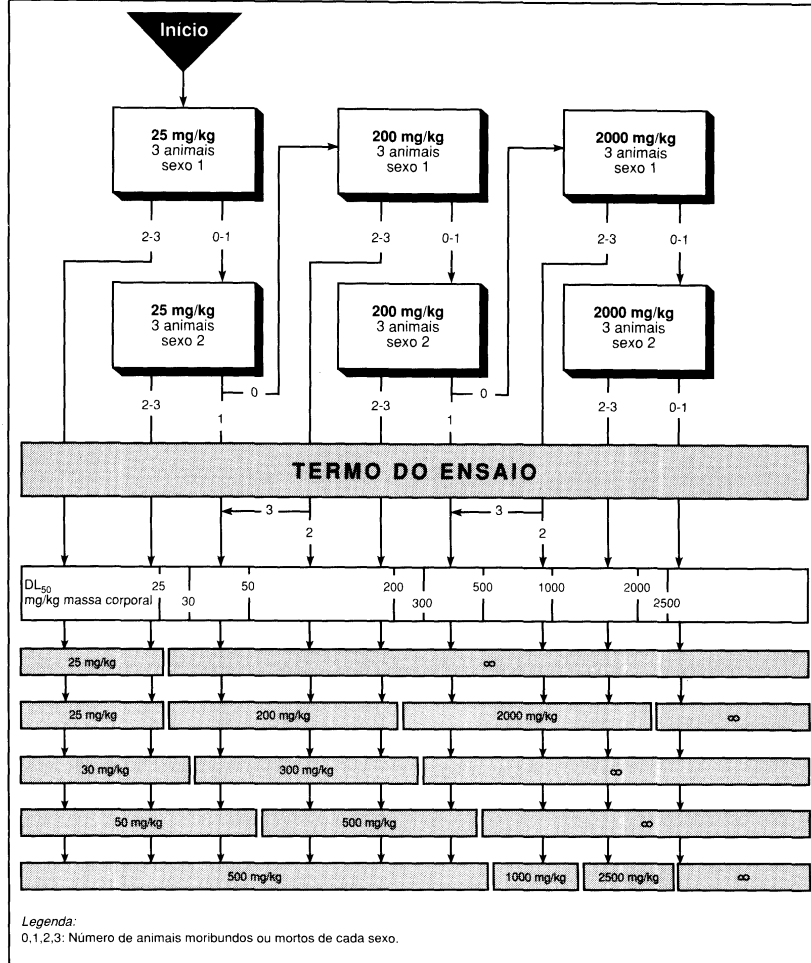
ANEXO 2

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A OPÇÃO DE ENSAIO Nº 1

As caixas cinzentas situadas abaixo das caixas «fim do ensaio» nos esquemas do presente anexo representam os valores-limite de classificação. De acordo com o procedimento descrito na opção 1, deve seguir-se a seta adequada até à caixa cinzenta correspondente.

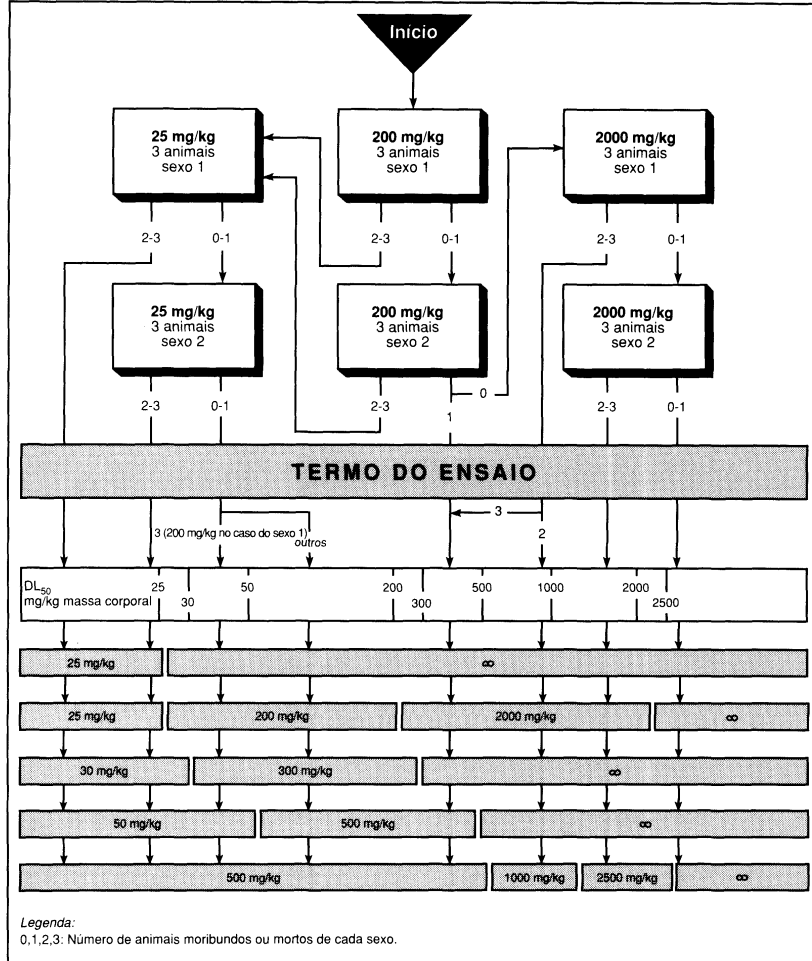
a) Interpretação dos resultados da opção 1

Dose de partida: 25 mg/kg de massa corporal



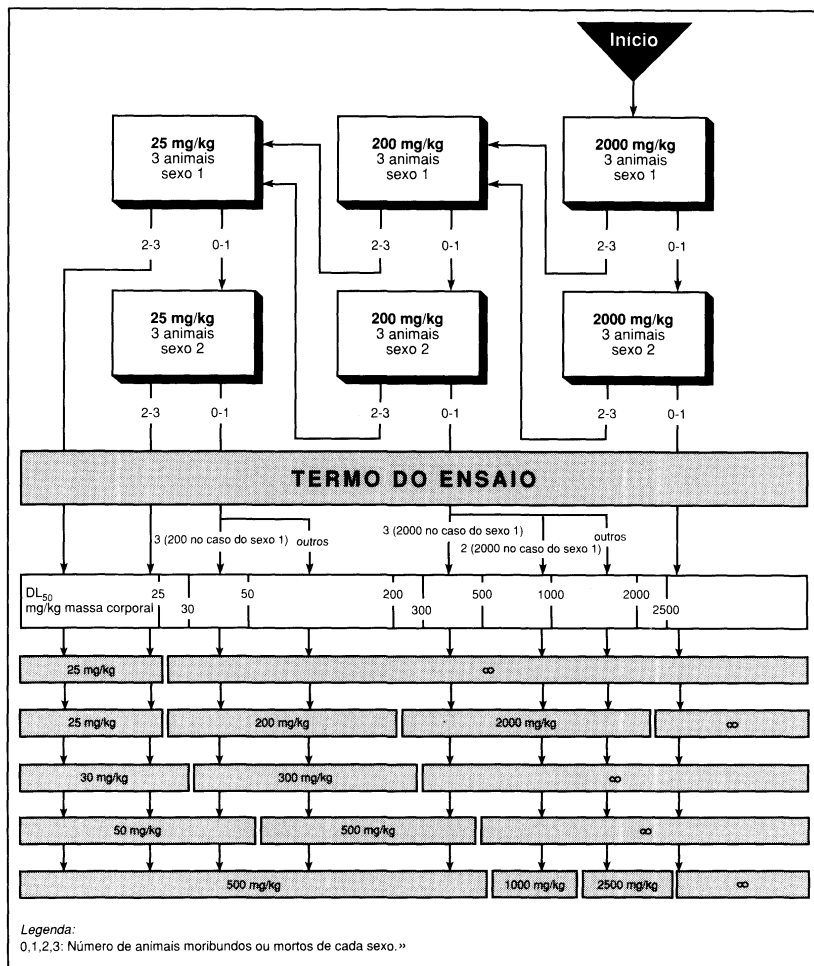
b) Interpretação dos resultados da opção 1

Dose de partida: 200 mg/kg de massa corporal



c) Interpretação dos resultados da opção 1

Dose de partida: 2 000 mg/kg de massa corporal



B.2. TOXICIDADE AGUDA (INALAÇÃO)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

É útil possuir informações preliminares sobre a distribuição granulométrica das partículas, pressão de vapor, ponto de fusão, ponto de ebulição, ponto de inflamação e explosividade (se aplicável) da substância de ensaio.

Ver também a introdução geral, parte B (ponto A).

1.2. DEFINIÇÕES

Ver introdução geral, parte B (ponto B).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Vários grupos de animais de experiência são expostos, durante um período determinado, a concentrações diferentes de substâncias a testar à razão de uma concentração por grupo. Subsequentemente procede-se à observação dos efeitos e das mortes ocorridas. Os animais que morrem durante o ensaio são submetidos a autópsia e no fim do ensaio os animais sobreviventes são também submetidos a autópsia.

Pode ser necessário sacrificar os animais que apresentem manifestações graves e permanentes de angústia e dor. Não se deve dosear as substâncias de ensaio de uma forma que se saiba provocar dor acentuada e angústia devido às suas propriedades corrosivas ou irritantes.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. Preparativos

Os animais são mantidos sob as condições de alojamento e alimentação experimentais durante pelo menos cinco dias antes do ensaio. Antes do ensaio procede-se a uma escolha aleatória de animais adultos jovens e saudáveis que são distribuídos por grupos de tratamento. Não é necessário submetê-los a uma exposição simulada a não ser que tal facto seja indicado pelo tipo de aparelho de exposição que se utiliza.

Pode ser necessário micronizar as substâncias de ensaio sólidas no sentido de se conseguir partículas com dimensões apropriadas.

Sempre que necessário pode adicionar-se à substância de ensaio um veículo adequado para ajudar a obter uma concentração adequada da substância de ensaio na atmosfera e deverá utilizar-se então um grupo de controlo tratado com veículo. No caso de se utilizar um veículo ou outros aditivos para facilitar a administração da dose, é necessário fazer a sua selecção entre os que não produzem efeitos tóxicos. Pode recorrer-se a dados históricos se for apropriado.

1.6.2. Condições de ensaio

1.6.2.1. Animais de experiência

Salvo no caso de haver contra-indicações o rato constitui a espécie preferencial. Devem utilizar-se as estirpes vulgarmente utilizadas em laboratório. Para cada sexo, no início do ensaio, o intervalo de variação do peso para os animais utilizados não deverá exceder $\pm 20\%$ do valor médio apropriado.

1.6.2.2. Número e sexo

Utilizam-se pelo menos 10 roedores (cinco fêmeas e cinco machos) para cada nível de

concentração. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas.

Nota: Nos ensaios de toxicidade aguda com animais de uma ordem superior à dos roedores deve levar-se em consideração a possibilidade de utilizar um menor número de animais. As doses deverão ser seleccionadas cuidadosamente e deverão ser feitos todos os esforços possíveis para não exceder as doses moderadamente tóxicas. Nestes ensaios deve evitar-se a administração de doses letais da substância de ensaio.

1.6.2.3. Concentrações de exposição

Estas devem ser em número suficiente, pelo menos três, e adequadamente espaçadas para originarem grupos de ensaio com uma diversidade de efeitos tóxicos e de taxas de mortalidade. Os dados deverão ser suficientes para permitirem traçar uma curva dose/resposta e, sempre que possível, uma determinação aceitável do valor CL50.

1.6.2.4. Teste limite

Se a exposição de cinco machos e cinco fêmeas a uma concentração de 20 mg/l de um gás ou 5 mg/l de um aerossol ou de partículas, durante quatro horas (ou, nos casos em que tal não seja possível, devido às propriedades físico-químicas, incluindo propriedades explosivas, da substância testada, à máxima concentração que seja possível utilizar), não provocar a morte de qualquer animal num prazo de 14 dias, pode considerar-se desnecessário prosseguir os testes.

1.6.2.5. Tempo de exposição

O período de exposição deve ser de quatro horas.

1.6.2.6. Equipamento

Os animais deverão ser expostos à substância a testar por meio de um dispositivo de inalação concebido de forma a conseguir-se um fluxo de ar contínuo que assegurará pelo menos 12 renovações de ar por hora e que garanta uma concentração de oxigénio apropriada e uma distribuição uniforme do produto a testar no ar. No caso de se utilizar uma câmara essa será concebida de maneira a obter-se uma superlotação mínima dos animais e uma exposição máxima da substância de ensaio. Como regra geral, para se assegurar a estabilidade da atmosfera na câmara, o «volume» total dos animais de experiência não deverá ultrapassar 5 % do volume da câmara de ensaio. Pode também recorrer-se a um sistema de exposição oronasal, de cabeça apenas ou de corpo inteiro em câmara individual; os dois primeiros tipos de exposição permitem reduzir a penetração por outras vias.

1.6.2.7. Período de observação

O período de observação deve ser de pelo menos 14 dias. Contudo o período de duração da observação não deve ser fixo rigidamente. Deve ser determinado pelas reacções tóxicas, o momento de aparecimento de sintomas e a duração do período de recuperação; em consequência pode ser prolongado quando se considerar necessário. O momento em que as manifestações de toxicidade aparecem e desaparecem e o momento da morte são importantes, especialmente se existir uma tendência para retardar as mortes.

1.6.3. Procedimento

Imediatamente antes da exposição, os animais são pesados e depois são expostos à concentração de ensaio no aparelho especificado durante um período de quatro horas, após equilíbrio da concentração na câmara de ensaio. O tempo para se estabelecer o equilíbrio deve ser curto. A temperatura de ensaio deve ser mantida a 22 ± 3 C. Em condições ideais a humidade relativa deverá ser mantida entre 30 % e 70 %, mas em alguns casos (por exemplo, em ensaios de alguns aerossóis) tal pode ser impraticável. A manutenção de uma pressão ligeiramente negativa no interior da câmara de ensaio (≤ 5 mm de água) evitará a fuga da substância de ensaio para o meio

envolvente. Durante o período de exposição não haverá fornecimento de alimentos nem de água. Devem ser utilizados sistemas adequados para gerar e monitorizar a atmosfera de ensaio. O sistema deve garantir que se atinja tão rapidamente quanto possível condições de exposição estáveis. A câmara de ensaio deverá ser concebida e utilizada de tal modo que se mantenha no seu interior uma distribuição homogénea da atmosfera de ensaio.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

- a) Débito de ar (permanentemente);
- b) Concentração real da substância a testar medida na zona de respiração, pelo menos três vezes durante a exposição (algumas atmosferas, por exemplo aerossóis em concentrações elevadas, podem necessitar de uma monitorização mais frequente). Durante o período de exposição diária a concentração não variará além de $\pm 15\%$ do valor médio. Contudo, no caso de alguns aerossóis, esta precisão pode não ser possível e uma variação maior poderá então ser aceitável. No caso dos aerossóis, efectuar-se-á uma análise granulométrica das partículas tantas vezes quantas forem necessárias (pelo menos uma vez por grupo de ensaio);
- c) Temperatura e humidade, continuamente se for possível.

Durante e após a exposição às concentrações são feitas observações e registadas sistematicamente;

são feitas fichas individuais para cada animal. As observações deverão ser efectuadas com frequência regular durante o primeiro dia. Deve efectuar-se um exame clínico cuidadoso pelo menos uma vez durante cada dia de trabalho, e deverão ser efectuadas outras observações diariamente tomando-se acções apropriadas para minimizar as perdas de animais submetidos a estudo, por exemplo, efectuar-se-á a autópsia ou a refrigeração dos animais encontrados mortos e efectuar-se-á o isolamento ou o sacrifício dos animais fracos ou moribundos.

As observações deverão incluir as modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, bem como a actividade somatomotora e do comportamento. Deve prestar-se particular atenção à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. O momento da morte deve ser registado com uma exactidão tão grande quanto possível. O peso de cada animal deve ser determinado semanalmente após a exposição e no momento da morte.

Os animais que morrem durante o ensaio e os sobreviventes no fim do ensaio são submetidos a autópsia com particular referência para quaisquer modificações no tracto respiratório superior e inferior. Deverão ser registadas todas as modificações patológicas. Sempre que for aconselhável deverão ser preparadas amostras dos tecidos para exame histopatológico.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser resumidos em quadros indicando-se para cada grupo de experiência o número de animais no início do teste, o momento da morte de cada animal, o número de animais que exibem outras manifestações de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e os resultados da autópsia. As variações de peso deverão ser calculadas e registadas quando o período de sobrevivência exceder um dia. Procede-se ao registo dos animais que tiverem que ser sacrificados devido à dor e à angústia associadas à substância procedendo-se de igual modo para as mortes associadas ao composto. O valor CL₅₀ pode ser determinado por um método reconhecido. A avaliação dos resultados deverá incluir a relação, se existir, entre a exposição dos animais à substância de ensaio e a incidência e gravidade de todas as anomalias, incluindo as anomalias de comportamento e clínicas, as lesões graves, as modificações do peso do corpo, a mortalidade e quaisquer outros efeitos toxicológicos.

3. RELATÓRIO

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

- espécies, estirpe, origem, condições ambientais, dieta, etc.;

- Condições de ensaio: descrição do aparelho de exposição incluindo projecto, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema para gerar aerossóis, método de condicionamento do ar e método para alojar animais na câmara de ensaio quando esta é utilizada. Deve fazer-se uma descrição do equipamento para a medição da temperatura, da humidade e das concentrações em aerossol e da distribuição granulométrica.

Resultados sobre a exposição

Estes resultados deverão ser agrupados em quadros e apresentados com valores médios e com uma medição de variabilidade (por exemplo, desvio padrão) e se possível deverão conter:

- a) Débitos de ar através do equipamento de inalação;
 - b) Temperatura e humidade do ar;
 - c) Concentrações nominais (quantidade total da substância de ensaio fornecida ao equipamento de inalação dividida pelo volume de ar);
 - d) Natureza do veículo, se for utilizado;
 - e) Concentrações reais na zona de respiração;
 - f) Diâmetro aerodinâmico médio de massa (DAMM) e desvio padrão geométrico (DPG);
 - g) Período de equilíbrio;
 - h) Período de exposição;
- apresentação de um quadro com os dados de resposta por sexo e por nível de exposição (isto é, número de animais que morreram ou que foram sacrificados durante o ensaio; número de animais que apresentam manifestações de toxicidade; número de animais expostos),
 - momento da morte durante ou após a exposição, razões e critérios utilizados para o sacrifício dos animais,
 - todas as observações,
 - valor CL50 determinado para cada sexo no fim do período de observação (com especificação do método de cálculo),
 - intervalo de confiança a 95 % para o valor CL50 (no caso de este poder ser obtido),
 - curva de dose/mortalidade e seu declive (sempre que permitido pelo método de determinação),
 - resultados da autópsia,
 - resultados das observações histopatológicas,
 - discussão dos resultados (deverá prestar-se particular atenção ao efeito que o sacrifício de animais durante o ensaio pode ter sobre o valor CL50 calculado),
 - interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver introdução geral, parte B (ponto D).

4. REFERÊNCIAS

Ver introdução geral, parte B (ponto E).

B.3. TOXICIDADE AGUDA (DÉRMICA)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

Ver introdução geral, parte B (ponto A).

1.2. DEFINIÇÃO

Ver introdução geral, parte B (ponto B).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhumas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Aplica-se a substância de ensaio sobre a pele de diversos grupos de animais de experiência, em doses graduadas, utilizando-se uma dose por grupo. Subsequentemente procede-se à observação dos efeitos e das mortes ocorridas. Os animais que morrem durante o ensaio são submetidos a autópsia e no fim do ensaio os animais sobreviventes são também submetidos a autópsia.

Pode ser necessário sacrificar os animais que apresentem manifestações graves e permanentes de angústia e dor. Não se deve dosear as substâncias de ensaio de uma forma que se saiba provocar dor acentuada e angústia devido às suas propriedades corrosivas ou irritantes.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. Preparativos

Os animais são mantidos nas suas gaiolas sob condições de alimentação e alojamento experimentais durante pelo menos cinco dias antes da experiência. Antes do ensaio os animais adultos jovens e saudáveis são seleccionados aleatoriamente e distribuídos por grupos de tratamento. Aproximadamente 24 horas antes do ensaio deve remover-se o pêlo da região dorsal dos animais, tosquiando-o ou rapando-o. Ao tosquiar ou ao rapar o pêlo é necessário tomar precauções para evitar lesões da pele que possam alterar a sua permeabilidade. A área destinada à aplicação da substância de ensaio não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. Sempre que se procede ao ensaio de substâncias sólidas, as quais podem ser pulverizadas quando necessário, a substância de ensaio deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. No caso de se utilizar um veículo, deve tomar-se em consideração a influência desse veículo relativamente à penetração da substância de ensaio na pele. Geralmente utilizam-se as substâncias de ensaio líquidas não diluídas.

1.6.2. Condições de ensaio

1.6.2.1. Animais de experiência

Pode ser utilizado o rato ou o coelho. Podem ser utilizadas outras espécies sendo necessário justificar a sua utilização. Devem utilizar-se as estirpes vulgarmente utilizadas em laboratório. Para cada sexo, no início do ensaio, o intervalo de variação do peso para os animais utilizados não deverá exceder $\pm 20\%$ do valor médio apropriado.

1.6.2.2. Número e sexo

Utilizam-se pelo menos cinco animais para cada dose. Devem ser todos do mesmo sexo. No caso de se utilizar fêmeas estas devem ser núlparas e não devem estar grávidas. No caso de existir informação disponível demonstrando que um dos sexos é nitidamente mais sensível, deve fazer-se a administração das doses aos animais desse sexo.

Nota: Nos ensaios de toxicidade aguda com animais de uma ordem superior à dos roedores deve

levar-se em consideração a possibilidade de utilizar um menor número de animais. As doses deverão ser seleccionadas cuidadosamente e deverão ser feitos todos os esforços possíveis para não exceder as doses moderadamente tóxicas. Nestes ensaios deve evitar-se a administração de doses letais da substância de ensaio.

1.6.2.3. Doses

Estas devem ser em número suficiente, pelo menos três, e adequadamente espaçadas para originarem grupos de ensaio com uma diversidade de efeitos tóxicos e de taxas de mortalidade. Ao tomar-se a decisão sobre as doses deve levar-se em consideração quaisquer efeitos irritantes ou corrosivos. Os dados deverão ser suficientes para permitirem traçar uma curva dose/resposta e, sempre que possível, uma determinação aceitável do valor DL50.

1.6.2.4. Teste limite

Pode efectuar-se um teste limite com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso do corpo num grupo de cinco machos e de cinco fêmeas utilizando os procedimentos anteriormente descritos. No caso de se observar mortalidade associada ao composto é necessário considerar a hipótese de realizar um estudo completo.

1.6.2.5. Período de observação

O período de observação deve ser de pelo menos 14 dias. Contudo o período de duração da observação não deve ser fixo rigidamente. Deve ser determinado pelas reacções tóxicas, o momento de aparecimento de sintomas e a duração do período de recuperação; em consequência pode ser prolongado quando se considerar necessário. O momento em que as manifestações de toxicidade aparecem e desaparecem e o momento da morte são importantes, especialmente se existir uma tendência para retardar as mortes.

1.6.3. Procedimento

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. A substância de ensaio será aplicada uniformemente numa área aproximadamente equivalente a 10 % da superfície total do corpo. No caso de substâncias altamente tóxicas, a superfície a utilizar poderá ser menor mas a camada da substância deverá ser o mais fina e uniforme possível.

A substância de ensaio deve ser mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo antialérgico, durante um período de exposição de 24 horas. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância de ensaio e de modo a evitar que os animais ingiram a substância. Podem ser utilizados aparelhos de contenção para evitar a ingestão da substância mas não se recomenda a imobilização completa.

No fim do período de exposição é necessário eliminar todos os resíduos da substância, se possível, utilizando água ou qualquer outro meio adequado para limpeza da pele.

As observações devem ser feitas e registadas sistematicamente. São feitas fichas individuais para cada animal. As observações deverão ser efectuadas com frequência regular durante o primeiro dia. Deve efectuar-se um exame clínico cuidadoso pelo menos uma vez durante cada dia de trabalho, e deverão ser efectuadas outras observações diariamente tomando-se acções apropriadas para minimizar as perdas de animais submetidos a estudo, por exemplo, efectuar-se-á a autópsia ou a refrigeração dos animais encontrados mortos e efectuar-se-á o isolamento ou o sacrifício dos animais fracos ou moribundos.

As observações deverão incluir as modificações do pêlo, pele tratada, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, bem como a actividade somatomotora e do comportamento. Deve prestar-se particular atenção à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. O momento da morte deve ser registado com uma exactidão tão grande quanto possível. Os animais que morrem

durante o ensaio e os que sobrevivem até ao fim do ensaio são submetidos a autópsia. Deverão ser registadas todas as modificações patológicas. Sempre que for aconselhável deverão ser preparadas amostras dos tecidos para exame histopatológico.

Avaliação da toxicidade no outro sexo

Depois de se ter completado o estudo relativamente a um dos sexos, submete-se a ensaio pelo menos um grupo de cinco animais do sexo oposto para se verificar se os animais desse sexo não são nitidamente mais sensíveis à substância de ensaio. Em circunstâncias individuais pode justificar-se a utilização de menos animais. No caso de existir informação adequada disponível suficiente para demonstrar que os animais do sexo testado são nitidamente mais sensíveis, é dispensável proceder a ensaios com animais do outro sexo.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser resumidos em quadros indicando-se para cada grupo de experiência o número de animais no início do teste, o momento da morte de cada animal, o número de animais que exibem outras manifestações de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e os resultados da autópsia. Os pesos de cada animal deverão ser determinados e registados imediatamente antes da administração da substância de ensaio, decorrida uma semana e no momento da morte; as variações de peso deverão ser calculadas e registadas quando o período de sobrevivência exceder um dia. Proceder-se ao registo dos animais que tiverem que ser sacrificados devido à dor e à angústia provocados pela substância procedendo-se de igual modo para as mortes provocadas pela substância. O valor DL50 pode ser determinado por um método reconhecido.

A avaliação dos resultados deverá incluir a relação, se existir, entre a exposição dos animais à substância de ensaio e a incidência e gravidade de todas as anormalidades, incluindo as anomalias de comportamento e clínicas, as lesões graves, as modificações do peso do corpo, a mortalidade e quaisquer outros efeitos toxicológicos.

3. RELATÓRIO

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

- espécies, estirpe, origem, condições ambientais, dieta, etc.,
- condições experimentais (incluindo o método de limpeza da pele e tipo de gaze: oclusiva ou não oclusiva),
- níveis de dosagem (com veículo no caso deste ser utilizado, e as concentrações),
- sexo dos animais submetidos à experiência,
- quadros com os dados de resposta por sexo e por valores de dosagem (isto é, número de animais que morreram ou que foram sacrificados durante os ensaios, número de animais que apresentam manifestações de toxicidade, número de animais expostos),
- momento da morte após a administração da dose, razões e critérios utilizados para o sacrifício dos animais,
- todas as observações,
- valor DL50 para o grupo do sexo submetido ao estudo completo ao longo do período de 14 dias (especificando-se o método de determinação),
- intervalo de confiança a 95 % para o valor DL50 (no caso de ser possível obter esse valor),
- curva dose/mortalidade e seu declive (no caso de isto ser possível com o método de determinação),
- resultados da autópsia,
- quaisquer resultados das observações histopatológicas,
- resultados de qualquer ensaio efectuado sobre o outro sexo,
- discussão dos resultados (deve prestar-se particular atenção ao efeito que o sacrifício dos animais durante o ensaio, pode ter sobre o valor DL50 calculado),
- interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver introdução geral, parte B (ponto D).

4. REFERÊNCIAS

Ver introdução geral, parte B (ponto E).

B. 6 SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Observações

A sensibilidade e capacidade dos métodos de ensaio para detectar substâncias que possam induzir sensibilização cutânea considera-se importante num sistema de classificação em matéria de toxicidade no domínio da saúde pública.

Não existe um método único que permita identificar de modo adequado todas as substâncias que possuam um potencial de sensibilização cutânea para o homem.

Na selecção do método de ensaio devem ter-se em conta factores tais como as características físicas da substância, nomeadamente a sua capacidade de penetração na pele.

Desenvolveram-se dois tipos de ensaios em porquinhos da Índia: ensaios com adjuvantes, em que a reacção alérgica é desencadeada por uma solução ou suspensão da substância em estudo em "adjuvante completo de Freund", e os ensaios sem adjuvantes.

Em geral, os ensaios com adjuvantes permitem determinar o potencial de sensibilização cutânea no homem com mais precisão que os métodos que não utilizam o "adjuvante completo de Freund", pelo que são preferíveis.

O ensaio de maximização em porquinhos da Índia constitui um método com adjuvante largamente utilizado. Embora possam utilizar-se vários outros métodos para determinar o potencial de sensibilização cutânea, o método em causa é considerado o mais adequado.

Os ensaios sem adjuvantes (de que o ensaio de Buehler constitui o mais popular) são considerados menos sensíveis quando aplicados a determinadas classes de substâncias.

Em alguns casos, podem existir motivos para a selecção do ensaio de Buehler, em que se procede à aplicação tópica, em vez do método de maximização em porquinhos da Índia, que utiliza a injeção intradérmica. No caso do recurso ao método de Buehler, deve fornecer-se a respectiva justificação.

O presente método descreve o ensaio de maximização em porquinhos da Índia e o método de Buehler. Pode recorrer-se a outros métodos devidamente validados cuja utilização seja cientificamente justificada.

Se um ensaio de despiste reconhecido fornecer um resultado positivo, a substância submetida ao ensaio pode ser designada potencialmente sensibilizante e pode não ser necessário efectuar subsequentemente um ensaio com cobaias. No entanto, se o referido ensaio fornecer um resultado negativo, é necessário efectuar um ensaio com cobaias segundo a metodologia aplicável ao presente método de ensaio.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. Definições

Sensibilização cutânea (dermatite de contacto alérgica): reacção cutânea, de origem imunológica, a uma determinada substância. No homem, a reacção pode incluir pruridos, eritema, edema, pápulas, vesículas, bolhas ou uma combinação dos mesmos. Em outras espécies, as reacções podem diferir, embora apenas se observe eritema e edema.

Exposição de indução: exposição experimental de um indivíduo a uma substância em estudo, com o objectivo de induzir uma reacção de hipersensibilidade.

Período de indução: período de, pelo menos, uma semana após a exposição de indução, durante o qual pode surgir uma reacção de hipersensibilidade.

Exposição de desencadeamento: exposição experimental a uma determinada substância, após o período de indução, de um indivíduo previamente exposto à mesma, de modo a averiguar uma eventual reacção de hipersensibilidade.

1.3. Substâncias de referência

A sensibilidade e a fiabilidade da técnica experimental utilizada devem ser determinadas semestralmente por recurso a substâncias que se saiba possuírem propriedades de sensibilização cutânea ligeiras ou moderadas.

Num ensaio realizado de forma adequada, a utilização de um sensibilizante ligeiro ou moderado deve determinar uma reacção de pelo menos 30 %, no caso de um ensaio com adjuvante, e de pelo menos 15 % no caso de um ensaio sem adjuvante.

Recomenda-se a utilização das substâncias seguintes:

Número CAS	Número EINECS	Denominação EINECS	Denominação comum
101-86-0	202-983-3	α -Hexilcinamaldeído	α -Hexilcinamaldeído
149-30-4	205-736-8	Benzotiazolo-2-tiol (mercapto-benzotiazolo)	Kaptax
94-09-7	202-303-5	Benzocaína	Norcaína

Em determinados casos devidamente justificados podem utilizar-se outras substâncias que satisfaçam os critérios atrás referidos.

1.4. Princípio do método de ensaio

Os animais utilizados são inicialmente expostos à substância em estudo por injeção intradérmica e/ou aplicação epidérmica (exposição de indução). Após um período de repouso de 14 dias (período de indução), durante o qual poderá observar-se uma reacção imunitária, os animais são expostos a uma dose de desencadeamento. A extensão e o grau da reacção cutânea à exposição de desencadeamento nos animais do lote de ensaio é comparada com a reacção observada nos animais do lote de controlo, sujeitos a um produto inactivo na fase da indução e objecto da exposição de desencadeamento.

1.5. Descrição do método de ensaio

Caso se afigure aconselhável a remoção da substância em estudo, deve utilizar-se para tal água ou um solvente adequado que não altere a reacção observada, bem como a integridade da epiderme.

1.5.1. Ensaio de maximização nos porquinhos da Índia

1.5.1.1. Preparação

Os animais (porquinhos da Índia albinos adultos, jovens e saudáveis) são aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, cinco dias. Antes do ensaio, procede-se à respectiva distribuição aleatória por lotes. O pelo é removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina ou, eventualmente, por depilação química, de acordo com o método utilizado. Deve evitar produzir-se feridas. Os animais são pesados antes do início do ensaio e após o respectivo termo.

1.5.1.2. Condições de ensaio

1.5.1.2.1. Animais de ensaio

Os animais devem ser porquinhos da Índia albinos de utilização corrente em laboratório.

1.5.1.2.2. Número e sexo

Podem utilizar-se animais de ambos os sexos. Caso se utilizem fêmeas, estas devem ser nulíparas e não-grávidas.

Utiliza-se um mínimo de 10 animais no lote de ensaio e um mínimo de 5 animais no lote de controlo. Caso se utilizem menos de 20 animais no lote de ensaio e menos de 10 animais no lote de controlo, não é possível concluir a natureza sensibilizante do produto, pelo que se recomenda vivamente a realização de ensaios com outros animais, até atingir os números referidos.

1.5.1.2.3. Doses

A concentração de substância em estudo, utilizada em cada exposição por indução deve apresentar uma boa tolerância sistémica e corresponder à concentração máxima que produz uma irritação cutânea ligeira a moderada. A concentração utilizada na exposição de desencadeamento deve consistir na dose máxima não irritante. Se necessário, as concentrações adequadas podem ser determinadas a partir de um estudo-piloto utilizando dois ou três animais. Para tal, devem utilizar-se animais objecto de ensaio com "adjuvante completo de Freund's".

1.5.1.3. Procedimento

1.5.1.3.1. Indução

Dia 0 — lote de ensaio

Administram-se três pares de injeções intradérmicas de 0,1 ml na região da espádua.

1ª Injeção: mistura "adjuvante completo de Freund's"/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

2ª Injeção: substância em estudo dissolvida num veículo adequado, na concentração escolhida.

3ª Injeção: substância em estudo dissolvida numa mistura "adjuvante completo de Freund's"/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v), na concentração escolhida.

Na 3ª injeção, as substâncias hidrossolúveis são dissolvidas na fase aquosa antes da mistura com "adjuvante completo de Freund's". As substâncias lipossolúveis ou insolúveis são suspensas em "adjuvante completo de Freund's" antes de adicionadas à fase aquosa. A concentração final da substância em estudo deve ser igual à utilizada na 2ª injeção.

A 1ª e 2ª injeções são administradas em regiões vizinhas, tão próximas quanto possível do crânio, enquanto que a 3ª injeção é administrada na parte posterior da zona de ensaio.

Dia 0 — lote de controlo

Administram-se três pares de injeções intradérmicas de 0,1 ml na mesma região que no caso dos animais utilizados no lote de ensaio.

1ª Injeção: mistura "adjuvante completo de Freund's"/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

2ª Injeção: veículo não diluído.

3ª Injeção: mistura a 50 % (m/v) do veículo numa mistura "adjuvante completo de Freund's"/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

5º dia — 7º dia — lotes de ensaio e de controlo

No caso de a substância não constituir um irritante cutâneo, a zona de ensaio, com o pelo previamente removido, é tratada, cerca de 24 horas antes da aplicação tópica de indução, com 0,5 ml de solução a 10 % de laurilsulfato de sódio em vaselina, de modo a produzir irritação local.

6º dia — 8º dia — lote de ensaio

O pelo é novamente removido da zona de ensaio. Impregna-se totalmente uma folha de papel de filtro (2 × 4 cm) da substância em estudo, dissolvida ou suspensa num veículo adequado, que se aplica na zona de ensaio, sendo mantida em contacto com a mesma durante 48 horas, com o auxílio de um penso oclusivo. Deve justificar-se a escolha do veículo utilizado. Os sólidos devem ser finamente divididos e incorporados num veículo adequado. Os líquidos podem ser aplicados directamente, se for caso disso.

6º dia — 8º dia — lote de controlo

O pelo é novamente removido da zona de ensaio. O veículo é aplicado de modo análogo ao anteriormente descrito, sendo também mantido em contacto com a referida zona durante 48 horas, com o auxílio de um penso oclusivo.

1.5.1.3.2. Desencadeamento

20º dia — 22º dia — lotes de ensaio e de controlo

Remove-se o pelo do flanco dos animais dos lotes de ensaio e de controlo. Aplica-se num dos flancos de cada animal um apósito ou uma câmara impregnados da substância em estudo; se necessário, pode aplicar-se no outro flanco um apósito ou uma câmara impregnados do veículo. Os sistemas em causa são mantidos em contacto com a pele com o auxílio de um penso oclusivo.

1.5.1.3.3. Observação e avaliação: lotes de ensaio e de controlo

- Cerca de 21 horas após a remoção do apósito ou da câmara, a zona em estudo é limpa, sendo o pelo removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina, se necessário.
- Cerca de 3 horas depois (ou seja, cerca de 48 horas após o início do ensaio), observa-se a reacção cutânea, que se regista de acordo com a escala indicada no apêndice.
- Cerca de 24 horas após a primeira observação (72 horas após o início do ensaio), procede-se a um novo exame, cujos resultados se registam de modo análogo.

Recomenda-se a realização de leituras cegas com os animais dos lotes de ensaio e de controlo.

Caso seja necessário clarificar os resultados obtidos no primeiro ensaio de desencadeamento, pode realizar-se um segundo ensaio com um novo lote de controlo, cerca de uma semana depois. Pode também realizar-se um segundo ensaio de desencadeamento com o mesmo lote de controlo.

Devem observar-se e registar-se de acordo com a escala de Magnusson/Kligman (ver apêndice) todas as reacções anormais, nomeadamente reacções sistémicas, resultantes dos processos de indução e desencadeamento. Além disso, podem efectuar-se outros exames, nomeadamente um exame histopatológico ou uma determinação da espessura da prega cutânea, com o objectivo de clarificar eventuais reacções duvidosas.

1.5.2. Ensaio de Buehler

1.5.2.1. Preparação

Os animais (porquinhos da Índia albinos adultos, jovens e saudáveis) são aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, cinco dias. Antes do ensaio, procede-se à respectiva distribuição aleatória por lotes. O pelo é removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina ou, eventualmente, por depilação química, de acordo com o método utilizado. Deve evitar produzir-se feridas. Os animais são pesados antes do início do ensaio e após o respectivo termo.

1.5.2.2. Condições de ensaio

1.5.2.2.1. Animais de ensaio

Os animais devem ser porquinhos da Índia albinos de utilização corrente em laboratório.

1.5.2.2.2. Número e sexo

Podem utilizar-se animais de ambos os sexos. Caso se utilizem fêmeas, estas últimas devem ser nulíparas e não-grávidas.

Utiliza-se um mínimo de 20 animais no lote de ensaio e um mínimo de 10 animais no lote de controlo.

1.5.2.2.3. Doses

A concentração de substância em estudo utilizada em cada exposição por indução deve corresponder à concentração máxima que produz uma irritação cutânea moderada. A concentração utilizada na exposição de desencadeamento deve consistir na dose máxima não irritante. Se necessário, as concentrações adequadas podem ser determinadas a partir de um estudo-piloto utilizando dois ou três animais.

No caso de as substâncias em estudo serem hidrossolúveis, deve utilizar-se como veículo água ou uma solução diluída de um tensoactivo não-irritante. Nos restantes casos, o veículo deve consistir numa mistura etanol/água a 80 % (ensaios de indução) ou acetona (ensaios de desencadeamento).

1.5.2.3. Procedimento

1.5.2.3.1. Indução

Dia 0 — lote de ensaio

Remove-se o pelo do flanco dos animais. O sistema de apósito é impregnado da substância em estudo, dissolvida ou suspensa num veículo adequado (deve justificar-se a escolha do veículo; as substâncias líquidas podem ser aplicadas sem diluição, se for caso disso) e aplicado na zona de ensaio, sendo mantido em contacto com a mesma durante 6 horas, com o auxílio de um apósito ou de uma câmara e de um penso adequado.

O sistema de apósito utilizado deve ser oclusivo. Pode utilizar-se uma mecha de algodão de forma circular ou quadrada, com 4 a 6 cm². De modo a garantir a oclusão, é aconselhável utilizar um dispositivo de imobilização adequado. Caso se utilize uma faixa, poderá ser necessário proceder a exposições adicionais.

Dia 0 — lote de controlo

O pelo é novamente removido da zona de ensaio. O veículo é aplicado de modo análogo ao anteriormente descrito, sendo também mantido em contacto com a referida zona durante 6 horas por intermédio de um penso oclusivo ou de uma câmara. Caso se conclua que não é necessário efectuar um controlo simulado, poderá efectuar-se um controlo mais simples.

6º dia — 8º dia e 13º dia — 15º dia — lotes de ensaio e de controlo

A substância em estudo é aplicada de modo análogo ao anteriormente descrito, na mesma zona e no mesmo flanco (se necessário, proceder à remoção do pelo), entre o 6º e o 8º dia e, de novo, entre o 13º e o 15º dia.

1.5.2.3.2. Desencadeamento

27º dia — 29º dia — lotes de ensaio e de controlo

Remove-se o pelo do flanco posterior dos animais dos lotes de ensaio e de controlo não sujeito a exposição prévia e aplica-se um penso oclusivo ou câmara impregnada da quantidade adequada da substância em estudo (concentração máxima não-irritante).

Se necessário, pode também aplicar-se um penso oclusivo ou câmara impregnada do veículo, ao flanco anterior dos animais de ambos os lotes não sujeito a exposição prévia. Os pensos ou câmaras são mantidos em contacto com a pele durante 6 horas, com o auxílio de um dispositivo adequado.

1.5.2.3.3. Observação e avaliação

— Cerca de 21 horas após a remoção do apósito ou da câmara, remove-se o pelo da área em estudo.

— Cerca de 3 horas depois (ou seja, cerca de 30 horas após o início do ensaio), observa-se a reacção cutânea, que se regista de acordo com a escala indicada em apêndice.

— Cerca de 24 horas após a primeira observação (54 horas após o início do ensaio), procede-se a um novo exame, cujos resultados se registam de modo análogo.

Recomenda-se a realização de leituras cegas com os animais dos lotes de ensaio e de controlo.

Caso seja necessário clarificar os resultados obtidos no primeiro ensaio de desencadeamento, pode realizar-se um segundo ensaio com um novo lote de controlo, cerca de uma semana depois. Pode também realizar-se um segundo ensaio de desencadeamento com o mesmo lote de controlo.

Devem observar-se e registar-se de acordo com a escala de Magnusson/Kligman (ver apêndice) todas as reacções anormais, nomeadamente reacções sistémicas, resultantes dos processos de indução e desencadeamento. Além disso, podem efectuar-se outros exames, nomeadamente um exame histopatológico ou uma determinação da espessura da prega cutânea, com o objectivo de clarificar eventuais reacções duvidosas.

2. DADOS (GPMT E ENSAIO DE BUEHLER)

Os dados devem ser apresentados de forma sumária num quadro, referindo, para cada animal, a reacção cutânea observada.

3. **RELATÓRIO (GPMT E ENSAIO DE BUEHLER)**

Caso se tenha realizado um ensaio de prospecção (por exemplo, ensaio ganglionar local — LINA — ou ensaio de tumefacção do pavilhão auditivo no ratinho — METS) antes do ensaio em porquinhos da Índia, deve fornecer-se, juntamente com os resultados obtidos com a substância em estudo e a substância de referência, detalhes relativos ao procedimento.

Relatório do ensaio (ensaio de maximização em porquinhos da Índia e ensaio de Buehler)

O relatório do ensaio deve incluir, sempre que possível, as seguintes informações:

Animais utilizados no ensaio:

- estirpe;
- número, idade e sexo dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, dieta administrada, etc.;
- massa de cada animal no início do ensaio.

Condições de ensaio

- pormenores relativos à preparação da zona de ensaio;
- pormenores relativos aos materiais e técnicas de apósito utilizadas;
- resultados dos estudos-piloto destinados a determinar as concentrações de indução e de desencadeamento utilizadas no ensaio;
- pormenores relativos à preparação, aplicação e remoção da substância em estudo;
- justificação da escolha do veículo;
- concentrações do veículo e da substância em estudo utilizadas nos ensaios de indução e de desencadeamento; quantidade total de substância aplicada nos ensaios de indução e de desencadeamento.

Resultados:

- resumo dos resultados do último controlo de sensibilidade e fiabilidade (ver 1.3), nomeadamente informações sobre a substância, a respectiva concentração e o veículo utilizado;
- dados relativos a cada animal, incluindo o sistema de classificação;
- descrição da natureza e gravidade dos efeitos observados;
- dados histopatológicos.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

O presente método é análogo ao método OCDE TG 406.

Apêndice

QUADRO:

Escala de Magnusson/Kligman para a avaliação das reacções ao ensaio de desencadeamento

- 0 = alterações não visíveis
 - 1 = eritema discreto ou localizado
 - 2 = eritema moderado ou confluyente
 - 3 = eritema intenso e tumefacção.
-

B.7 TOXICIDADE ORAL DA DOSE REPETIDA (28 DIAS)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.2. Definições

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.3. Princípio do método de ensaio

A substância em estudo é administrada diariamente por via oral, em doses crescentes (uma dose por lote), a vários lotes de animais de ensaio, durante um período de 28 dias. No decurso deste período, os animais são examinados diariamente em pormenor, com vista à detecção de quaisquer sinais de toxicidade. Efectua-se a autópsia dos animais que morrem ou são abatidos durante o ensaio e, no final do mesmo, procede-se ao abate dos sobreviventes e à respectiva autópsia.

O presente método concede especial importância aos efeitos neurológicos, devendo efectuar-se um exame clínico pormenorizado dos animais, de modo a obter o máximo possível de informações. O método deverá permitir identificar substâncias com potencial neurotóxico, que poderão necessitar de uma investigação mais aprofundada. Além disso, o método pode fornecer indicações sobre os eventuais efeitos imunológicos e a eventual toxicidade sobre os órgãos reprodutores.

1.4. Descrição do método de ensaio

1.4.1. Preparação

Seleccionam-se de modo aleatório animais adultos jovens e saudáveis, que se repartem pelos lotes de ensaio e de controlo. Devem dispor-se as gaiolas de forma a minimizar eventuais efeitos devidos à respectiva localização. Os animais são identificados individualmente e mantidos nas gaiolas durante pelo menos cinco dias antes do início do ensaio, de modo a permitir a aclimação às condições laboratoriais.

A substância em estudo é administrada por intermédio de uma sonda gástrica ou através da alimentação ou da água para beber. O método de administração oral depende do objectivo do ensaio, bem como das propriedades físico-químicas da substância.

Se necessário, a substância é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se o uso de uma solução ou suspensão aquosa ou, se tal não for possível, uma solução ou emulsão num óleo (nomeadamente óleo de milho) ou ainda uma solução noutro veículo. No caso de se utilizar um veículo não-aquoso, devem conhecer-se as respectivas características de toxicidade. Deve também determinar-se a estabilidade da substância no veículo utilizado.

1.4.2. Condições de ensaio

1.4.2.1. Animais de ensaio

Embora possa recorrer-se outros roedores, o rato constitui a espécie preferida. Devem utilizar-se animais adultos, jovens e saudáveis, de estirpes correntes de laboratório. As fêmeas devem ser nulíparas e não-grávidas. A administração da substância deve ter início logo que possível após o desmame e, em qualquer caso, antes de os animais completarem nove semanas de idade.

No início do estudo, a variação de massa dos animais deve ser mínima, não excedendo + 20 % da massa média de cada sexo.

Caso um ensaio de toxicidade oral da dose repetida preceda um estudo a longo prazo, é conveniente utilizar em ambos os ensaios animais da mesma estirpe e proveniência.

1.4.2.2. Número e sexo

Para cada dose, devem utilizar-se, pelo menos, 10 animais (5 machos e 5 fêmeas). Caso se preveja o sacrifício de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar.

Além disso, pode administrar-se a um lote extra de animais (5 de cada sexo), durante 28 dias, a dose mais elevada, com o objectivo de estudar a reversibilidade, a persistência ou a manifestação

retardada de efeitos tóxicos nos 14 dias subsequentes à administração. Utiliza-se também um lote satélite de 10 animais (5 de cada sexo) no ensaio de controlo.

1.4.2.3. Doses

De modo geral, devem utilizar-se, no mínimo, três lotes de ensaio e um lote de controlo. Excepto no que respeita à administração da substância em estudo, deve proceder-se com os animais do lote de controlo do mesmo modo que com os animais dos lotes de ensaio. Caso se recorra a um veículo para a administração da substância em estudo, deve administrar-se o volume máximo do mesmo aos animais do lote de controlo.

Se, com base em outros dados, for previsível que a dose de 1 000 mg/kg de massa corporal e dia não determine quaisquer efeitos, pode proceder-se a um ensaio-limite. Na ausência de dados adequados, pode realizar-se um rastreio, de modo a determinar as doses a administrar.

Na selecção das doses devem ter-se em conta os eventuais dados disponíveis em matéria de toxicidade e toxicocinética referentes à substância em causa ou a produtos afins. A dose mais elevada deve ser escolhida com o objectivo de induzir efeitos tóxicos, evitando contudo a morte e o sofrimento intenso. Posteriormente, deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos adversos associados à administração da dose mínima (NOAEL). A diferença óptima entre as doses consiste, frequentemente, num factor de 2 a 4; em muitos casos, a utilização de um quarto lote de ensaio é preferível ao recurso a intervalos de grande amplitude (superior a um factor de 10) entre as doses.

Caso a substância em estudo seja administrada através dos alimentos ou da água para beber, deve assegurar-se que as respectivas quantidades não perturbam o equilíbrio nutricional e o balanço hídrico normais. Se a substância for administrada com os alimentos, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante, expressa em ppm, ou uma dose constante, expressa em relação à massa corporal dos animais; deve especificar-se a alternativa adoptada. No caso do recurso a uma sonda gástrica, a dose deve ser administrada diariamente à mesma hora e, se necessário, ajustada de modo a manter uma dose constante em relação à massa corporal do animal.

Caso um ensaio de toxicidade oral da dose repetida preceda um estudo a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

1.4.2.4. Ensaio-limite

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de massa corporal e dia ou, no caso da administração através dos alimentos ou da água para beber, uma percentagem equivalente em relação aos mesmos (com base na determinação da massa corporal), não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se preveja o surgimento de efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um estudo completo com três doses. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.4.2.5. Período de observação

O período de observação deve ser de 28 dias. Os animais incluídos nos lotes extras destinados a ensaios subsequentes devem ser mantidos em observação durante, pelo menos, 14 dias suplementares, de modo a detectar a ocorrência retardada, a persistência ou a recuperação dos efeitos tóxicos.

1.4.3. Procedimento

A substância é administrada diariamente aos animais durante um período de 28 dias; em casos devidamente justificados, pode proceder-se à administração cinco dias por semana. A administração forçada deve efectuar-se numa dose única, por intermédio de uma sonda gástrica ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido administrado em cada operação depende das dimensões do animal, não devendo exceder 1 ml/100 g de massa corporal, excepto no que respeita a soluções aquosas, em que podem utilizar-se 2 ml/100 g de massa corporal. Salvo no caso de substâncias corrosivas ou irritantes, cujos efeitos são, de modo geral,

agravados em concentrações mais elevadas, devem minimizar-se as variações no volume mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante para todas as doses.

1.4.3.1. Observações gerais

Deve efectuar-se um exame clínico pelo menos uma vez por dia, de preferência à mesma hora, em função do período previsto de efeitos mais agudos devidos à administração da substância, registando-se o estado de saúde dos animais. Além disso, deve proceder-se à observação de todos os animais pelo menos duas vezes por dia, de modo a determinar a respectiva morbilidade e mortalidade. Os animais moribundos, bem como aqueles que apresentem sinais de dor e sofrimento intensos, devem ser removidos, abatidos por intervenção humana e autopsiados. Deve proceder-se a um exame clínico aprofundado de todos os animais pelo menos uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir efectuar comparações com o mesmo indivíduo) e pelo menos uma semana após a mesma. O exame deve decorrer no exterior da gaiola, num recinto adequado e, de preferência, à mesma hora. As observações devem ser cuidadosamente registadas, de preferência por recurso a um sistema definido em pormenor pelo laboratório em causa. Devem procurar minimizar-se eventuais alterações das condições de ensaio e de assegurar que a observação seja efectuada por pessoal exterior ao mesmo. Os sinais anotados devem incluir alterações na pele, no pêlo, nos olhos e nas mucosas, bem como a ocorrência de secreções, excreções ou actividade autónoma (como, por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, alterações nas pupilas, respiração anormal). Deve também registar-se quaisquer alterações da atitude, postura e reacção à manipulação, além da ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e comportamentos estereotipados (por exemplo, actos de higiene repetitivos, movimentos circulares repetitivos) ou estranhos (auto-mutilação, marcha para a retaguarda).

Na 4ª semana de exposição, deve determinar-se a reacção sensorial a diversos tipos de estímulos (auditivos, visuais e proprioceptivos), bem como a força da preensão e a actividade motora. A bibliografia indicada na parte B da Introdução Geral fornece pormenores sobre os procedimentos a adoptar.

Se o ensaio em causa preceder um estudo de toxicidade subcrónica a 90 dias, podem omitir-se as observações funcionais na 4ª semana de exposição, que deverão efectuar-se no âmbito do ensaio subsequente. Além disso, a existência de dados relativos a observações funcionais efectuadas no âmbito do ensaio da dose repetida facilita a selecção das doses a utilizar no estudo de toxicidade subcrónica posterior.

Excepcionalmente, podem omitir-se as observações funcionais no caso de lotes que apresentem sinais de toxicidade numa extensão susceptível de interferir de modo significativo com as mesmas.

1.4.3.2. Massa corporal e consumo de alimentos e água para beber

Todos os animais devem ser pesados com uma frequência pelo menos semanal, devendo também determinar-se, com a mesma frequência, a quantidade de alimentos e de água para beber consumidos, facto que se reveste de especial importância no caso de a substância em estudo ser administrada através da água para beber.

1.4.3.3. Hematologia

No final do ensaio, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e medida do tempo/potencial de coagulação.

As colheitas de sangue devem ser efectuadas numa zona determinada, imediatamente antes do abate dos animais ou no âmbito do mesmo, devendo armazenar-se as amostras em condições adequadas.

1.4.3.4. Bioquímica clínica

Devem também efectuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com amostras de sangue de todos os animais, colhidas imediatamente antes do respectivo abate ou no âmbito do mesmo (à

excepção dos animais encontrados moribundos ou abatidos no decurso do ensaio). Recomenda-se que os animais sejam jejuados desde a véspera da colheita de sangue (1). Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glucose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, além de, pelo menos, dois enzimas indicadores dos efeitos hepatocelulares (tais como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase, a fosfatase alcalina, a α -glutamyl-transpeptidase e a sorbitol-desidrogenase). A determinação de outros enzimas de origem hepática ou diversa, bem como de ácidos biliares, poderá, em determinados casos, proporcionar informações úteis.

(1) No caso de algumas determinações no soro e no plasma, como é o caso da glucose, é aconselhável jejuar os animais desde a véspera. O principal motivo deste facto reside em que a maior variabilidade dos resultados determinada pela ausência de jejum pode ocultar determinados efeitos, dificultando a interpretação dos resultados. No entanto, o jejum desde a véspera pode interferir com o metabolismo geral dos animais, nomeadamente no caso de estudos por via alimentar, alterando a exposição diária à substância em estudo. Assim, caso se opte pelo jejum desde a véspera, as análises bioquímicas devem ser efectuadas após observações funcionais a realizar na 4 semana do ensaio.

Como opção, podem realizar-se na última semana do ensaio as seguintes determinações na urina, recolhida de acordo com um programa previamente estabelecido: aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glucose e sangue/hematócitos.

Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Caso as propriedades conhecidas da substância afectem, ou se preveja que possam afectar, o perfil metabólico da mesma, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente de cálcio, fosfatos, triglicéridos em jejum, hormonas específicas, meta-hemoglobina e colinesterase. A necessidade de efectuar tais determinações é estabelecida em função do tipo de substância em estudo ou de cada caso específico.

De modo geral, deve adoptar-se uma abordagem flexível, em função das espécies e dos efeitos observados ou previstos da substância em causa.

Se os dados disponíveis relativos a ensaios anteriores se revelarem inadequados, devem determinar-se parâmetros hematológicos e bioquímicos antes de administrar a substância.

1.4.3.5. Autópsia

Todos os animais devem ser objecto de uma autópsia pormenorizada que inclua o exame da superfície exterior do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal, bem como do respectivo conteúdo. Devem remover-se de modo adequado as membranas aderentes a órgãos tais como o fígado, os rins, as glândulas supra-renais, os testículos, os epidídimos, o timo, o baço, o cérebro e o coração, cuja massa húmida deve ser determinada logo que possível após a dissecação, de modo a evitar a respectiva dessecação.

Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todos os tecidos que apresentem lesões evidentes, encéfalo (regiões representativas, nomeadamente cérebro, cerebelo e protuberância), espinal medula, estômago, intestino delgado e cólon (incluindo as placas de Peyer), fígado, rins, glândulas supra-renais, baço, coração, timo, tiróide, traqueia e pulmões (conservados por insuflação com fixador seguida de imersão), gónadas, órgãos genitais acessórios (por exemplo, útero e próstata), bexiga, gânglios linfáticos (de preferência um gânglio situado na via de administração e um gânglio distante da mesma, de modo a investigar possíveis efeitos sistémicos), nervos periféricos (ciático ou tibial), nomeadamente na proximidade de músculos, e uma secção de medula óssea (ou, como alternativa, um aspirado de medula óssea recentemente montado). Em função das observações clínicas ou de natureza diversa efectuadas, poderá ser necessário examinar outros tecidos. Devem também conservar-se quaisquer órgãos susceptíveis de constituírem alvos da substância em estudo, em virtude das propriedades conhecidas da mesma.

1.4.3.6. Exame histopatológico

Deve proceder-se ao exame histopatológico dos órgãos e tecidos conservados dos animais do lote de controlo, bem como dos lotes sujeitos a doses elevadas. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes.

Devem examinar-se todas as lesões importantes.

Sempre que se recorra a um lote extra, deve proceder-se ao exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos restantes lotes.

2. DADOS

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais utilizados, o número de animais encontrados mortos ou abatidos por intervenção humana, a hora da morte de cada animal, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o tempo decorrido até à respectiva manifestação, bem como a sua duração e gravidade, o número de animais que apresentem lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões.

Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por recurso a um método estatístico de aceitação geral, cuja escolha deve ser efectuada na fase de concepção do ensaio.

3. RELATÓRIO

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir, sempre que possível, as seguintes informações:

Animais utilizados no ensaio:

- espécie/estirpe;
- número, idade e sexo dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, dieta administrada, etc.;
- massa de cada animal determinada no início do ensaio, semanalmente após a administração da substância e no final do ensaio.

Condições de ensaio:

- justificação da escolha de um veículo não-aquoso;
- motivo da selecção da dose de partida;
- pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à sua eventual incorporação nos alimentos, nomeadamente a respectiva concentração, estabilidade e homogeneidade;
- pormenores relativos à administração da substância em estudo;
- equivalência entre a concentração da substância em estudo nos alimentos ou na água para beber, expressa em ppm, e a dose, expressa em mg/kg de massa corporal, se for caso disso;
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

Resultados:

- massa corporal e respectivas alterações;
- consumo de alimentos e de água, se for caso disso;
- reacções tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente sinais de toxicidade;
- natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);
- dados relativos à actividade sensorial, força de preensão e actividade motora;
- resultados da análise hematológica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base;
- resultados da análise bioquímica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base;
- massa corporal aquando do abate e massa dos diversos órgãos;
- dados obtidos por autópsia;
- dados histopatológicos pormenorizados;
- dados de absorção, caso se encontrem disponíveis;
- tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. REFERÊNCIAS

O presente método é análogo ao método OCDE TG 407

B.8. TOXICIDADE (INALAÇÃO) DA DOSE REPETIDA (28 DIAS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

É útil possuir informações preliminares sobre a distribuição granulométrica, a pressão de vapor, o ponto de fusão, o ponto de ebulição, o ponto de inflamação e a explosividade (se aplicável) da substância.

Ver também a introdução geral, parte B (ponto A).

1.2. DEFINIÇÃO

Ver introdução geral, parte B (ponto B).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Vários grupos de animais de experiência são expostos diariamente, por um período determinado, a concentrações diferentes das substâncias a ensaiar, à razão de uma concentração por grupo, durante um período de 28 dias. No caso de se utilizar um veículo para auxiliar a obter uma concentração apropriada da substância de ensaio na atmosfera, deve utilizar-se um grupo de controlo para o veículo. Durante o período de administração os animais são observados diariamente para se detectar as manifestações de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados e no fim da experiência os animais sobreviventes são igualmente autopsiados.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do ensaio. Antes de se começar o ensaio os animais jovens e saudáveis são distribuídos aleatoriamente pelos grupos submetidos ao tratamento e pelo grupo de controlo. Se necessário pode adicionar-se um veículo à substância de ensaio para se conseguir uma concentração apropriada desta na atmosfera; no caso de se utilizar um veículo ou outros aditivos para facilitar a administração, devem ser comprovadamente não tóxicos. Pode recorrer-se a dados anteriormente publicados, se necessário.

1.6.2. Condições da experiência

1.6.2.1. Animais de experiência

Salvo contra-indicação a espécie preferida é o rato. Devem utilizar-se animais jovens e saudáveis de uma estirpe vulgarmente utilizada em laboratório. No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar $\pm 20\%$ do peso médio apropriado.

1.6.2.2. Número e sexo

Para cada grupo de ensaio serão utilizados pelo menos 10 animais (cinco fêmeas e cinco machos). As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência, deve acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê vir a sacrificar. Para além destes, poderá haver um grupo satélite de 10 animais (cinco animais de cada sexo) tratado com a dose mais elevada durante 28 dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante 14 dias após o tratamento. Utiliza-se também um grupo satélite de 10 animais de controlo (cinco animais de

cada sexo).

1.6.2.3. Concentração de exposição

São utilizadas pelo menos três concentrações, com um grupo de controlo ou, se necessário, com um grupo de controlo para o veículo quando este for utilizado (correspondendo à concentração do veículo ao nível de exposição mais elevada). Os animais do grupo de controlo são tratados da mesma forma que os animais dos grupos de experiência com excepção da inalação da substância de ensaio. A concentração mais elevada deverá produzir efeitos tóxicos mas nenhuma ou poucas mortes. A menor concentração não deverá produzir quaisquer manifestações de toxicidade. No caso de se dispôr de informação sobre a exposição humana, a concentração mais baixa será superior a esse valor. O ideal seria a concentração intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observável. No caso de se utilizar várias concentrações intermédias, a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos grupos de concentração baixa e intermédia, assim como nos grupos de controlo, a incidência de mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

1.6.2.4. Tempo de exposição

A duração da exposição diária deverá ser de seis horas, podendo utilizar-se outros períodos para satisfazer exigências específicas.

1.6.2.5. Equipamento

Os animais serão expostos à substância de ensaio por meio de um dispositivo de inalação concebido de forma a conseguir-se um fluxo de ar contínuo que assegurará pelo menos 12 renovações de ar por hora e que garanta uma concentração de oxigénio apropriada e uma distribuição uniforme do produto de ensaio no ar. No caso de se utilizar uma câmara, esta será concebida de maneira a obter-se uma superlotação mínima dos animais e uma exposição máxima à substância de ensaio. Como regra geral, para se assegurar a estabilidade da atmosfera na câmara, o «volume» total dos animais de experiência não deverá ultrapassar 5 % do volume da câmara de ensaio. Pode recorrer-se também a um sistema de exposição oro-nasal, apenas de cabeça ou do corpo inteiro, em câmara individual; os dois primeiros tipos de exposição permitem reduzir a penetração por outras vias.

1.6.2.6. Período de observação

Os animais da experiência deverão ser observados diariamente para se detectar manifestações de toxicidade durante todo o período de exposição e de recuperação. Proceder-se-á ao registo do momento da morte e bem assim do momento do aparecimento e desaparecimento das manifestações de toxicidade.

1.6.3. Procedimento

Os animais são expostos diariamente à substância de ensaio, cinco a sete dias por semana, durante um período de 28 dias. Os animais dos grupos satélites destinados às observações complementares serão mantidos vivos durante mais 14 dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou persistência dos efeitos tóxicos. A temperatura a que se efectua o ensaio deverá ser mantida a 22 ± 3 C.

Em condições óptimas, a humidade relativa deverá ser mantida entre 30 % e 70 % mas, nalguns casos, isto pode ser impraticável (por exemplo, nos ensaios com aerossóis). A manutenção de uma pressão ligeiramente negativa no interior da câmara de ensaio (≤ 5 mm de água) evitará a fuga da substância de ensaio para o meio envolvente. Durante a exposição os animais não receberão alimentos nem água.

Deverá ser utilizado um sistema de inalação dinâmico com um dispositivo apropriado de controlo analítico da concentração. Recomenda-se a realização de um ensaio preliminar para se

determinar as concentrações apropriadas de exposição. O débito de ar deverá assegurar concentrações homogêneas em toda a câmara de exposição. O sistema deverá permitir a obtenção de condições estáveis o mais rapidamente possível.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

a) Débito de ar (permanentemente);

b) A concentração real da substância de ensaio medida na zona de respiração. Durante o período de exposição diária a concentração não variará além de $\pm 15\%$ do valor médio. Contudo, no caso de alguns aerossóis esta precisão pode não ser possível e poderá ser aceitável uma variação maior. Durante toda a duração da experiência as concentrações diárias serão mantidas o mais constantes possível. Para os aerossóis dever-se-á efectuar semanalmente e por grupo de ensaio pelo menos uma análise granulométrica das partículas.

c) Temperatura e humidade, continuamente se for possível.

Durante e após a exposição às concentrações são feitas observações e registadas sistematicamente; são feitas fichas individuais para cada animal. Todos os animais serão observados diariamente e as manifestações de toxicidade, assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e a sua duração, serão registados. As observações deverão incluir as modificações da pele e do pêlo, dos olhos, das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, da actividade somatomotora e do comportamento. Determinar-se-á semanalmente o peso dos animais. Recomenda-se também a determinação do consumo alimentar semanal. Deve observar-se regularmente os animais para se evitar perdas, tanto quanto possível, causadas por canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. No fim da experiência todos os animais sobreviventes dos grupos tratados não satélites serão autopsiados. Os animais moribundos e os animais que apresentem graves sintomas de angústia ou dor deverão ser imediatamente retirados, sacrificados e submetidos a autópsia. Os exames a seguir enunciados deverão ser efectuados no fim do período de ensaio para todos os animais incluindo os controlos:

i) Um exame hematológico compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária, bem como um estudo sobre o potencial de coagulação;

ii) A determinação de dados bioquímicos do sangue incluindo pelo menos um parâmetro da função hepática e renal: alanina aminotransferase (inicialmente conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica), aspartato aminotransferase (inicialmente conhecida como transaminase glutâmico-oxalo-acética), azoto ureíco, albumina, creatinina plasmática, bilirubina total e as proteínas séricas totais.

As outras análises eventualmente necessárias para uma avaliação toxicológica adequada incluem as análises de cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum, análises de lípidos, de hormonas, equilíbrio ácido-básico, meta-hemoglobina, e actividade colinesterásica. Pode recorrer-se a outras análises bioquímicas clínicas sempre que necessário para melhorar a investigação dos efeitos observados.

1.6.3.1. Autópsia

Todos os animais submetidos a experiência deverão ser submetidos a uma autópsia geral. Pelo menos o fígado, os rins, as glândulas supra-renais, pulmões e os testículos deverão ser pesados ainda húmidos, tão cedo quanto possível após a dissecação para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Tanto os órgãos como os tecidos (tracto respiratório, fígado, rim, baço, testículos, glândulas supra-renais, coração e quaisquer órgãos que apresentem lesões graves ou alterações de volume) deverão ser conservados num meio adequado para um eventual exame histopatológico futuro. Os pulmões deverão ser removidos intactos, pesados e tratados com um fixador adequado para se garantir que a estrutura do pulmão é mantida.

1.6.3.2. Exame histopatológico

No grupo tratado com a concentração mais elevada e nos grupos de controlo o exame histológico deverá ser efectuado em órgãos e tecidos conservados. Os órgãos e tecidos que apresentem efeitos susceptíveis de serem atribuídos à substância de ensaio administrada na dose mais elevada deverão ser examinados em todos os grupos tratados com doses inferiores. Deve proceder-se a um exame histológico dos animais de qualquer grupo satélite com particular ênfase sobre os órgãos e tecidos que apresentaram efeitos identificados nos outros grupos tratados.

2. RESULTADOS

Os resultados serão resumidos na forma de quadros indicando, para cada experiência, o número de animais no início do ensaio e o número de animais que apresenta cada tipo de lesão. Todos os resultados observados deverão ser avaliados por um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

- Espécie, estirpe, origem, condições ambientais, dieta, etc.;
- Condições experimentais;

Descrição do aparelho de exposição incluindo projecto, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de aerossóis, método de condicionamento de ar, tratamento do ar evacuado e, no caso disso, o método de acondicionamento dos animais na câmara de ensaio. Deve apresentar-se uma descrição do equipamento utilizado para medir a temperatura, a humidade, e se necessário, a estabilidade das concentrações do aerossol ou da distribuição granulométrica das partículas.

Dados relativos à exposição:

Estes dados serão apresentados sob a forma de um quadro indicando os valores médios, assim como uma medida de variação (por exemplo, o desvio-padrão) e dirão respeito:

- a) Aos débitos de ar através do dispositivo de inalação;
 - b) À temperatura e à humidade do ar;
 - c) Às concentrações nominais (quantidade total da substância de ensaio introduzida no dispositivo de inalação, dividida pelo volume de ar);
 - d) À natureza do veículo, se utilizado;
 - e) Às concentrações reais na zona de respiração;
 - f) Ao diâmetro aerodinâmico médio de massa (DAMM) e ao desvio-padrão geométrico (DPG);
- resposta tóxica por sexo e por concentração,
 - momento da morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes,
 - descrição dos efeitos tóxicos ou outros; dose que não produz efeito,
 - momento de observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,
 - dados relativos à alimentação e peso corporal,
 - exames hematológicos efectuados e seus resultados,
 - testes bioquímicos clínicos utilizados e seus resultados,
 - resultados da autópsia,
 - descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,
 - tratamento estatístico dos resultados sempre que possível,
 - discussão dos resultados,
 - interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver introdução geral, parte B (ponto D).

4. REFERÊNCIAS

Ver introdução geral, parte B (ponto E).

B.9. TOXICIDADE (DÉRMICA) DA DOSE REPETIDA (28 DIAS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

Ver introdução geral parte B (ponto A).

1.2. DEFINIÇÕES

Ver introdução geral, parte B (ponto B).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Administra-se à pele diariamente a substância de ensaio, em doses graduadas, a diversos grupos de animais de experiência, utilizando-se uma dose por grupo durante um período de 28 dias. Durante o período de administração observa-se os animais diariamente para se detectar manifestações de toxicidade. Faz-se a autópsia dos animais mortos durante o ensaio e no final do ensaio faz-se também a autópsia dos animais que sobreviveram ao teste.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. Preparativos

Os animais são mantidos sob as condições de alojamento e alimentação experimentais durante pelo menos cinco dias antes do ensaio. Antes do ensaio procede-se a uma escolha aleatória de animais adultos, jovens e saudáveis e que são distribuídos por grupos de tratamento. Pouco tempo antes de se iniciar o ensaio rapa-se os pêlos da região dorsal dos animais. No caso de se recorrer à tosquia esta deverá ser efectuada aproximadamente 24 horas antes do ensaio. Normalmente é necessário repetir estas operações todas as semanas, devendo tomar-se muito cuidado para não lesar a pele. A área destinada à aplicação da substância de ensaio não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. O peso do animal deverá ser tomado em consideração na decisão da zona a expor e da dimensão da superfície a tratar. Sempre que se procede ao ensaio de substâncias sólidas, as quais podem ser pulverizadas se necessário, a substância de ensaio deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. As substâncias de ensaio líquidas são geralmente utilizadas sem serem diluídas. Procede-se a uma aplicação diária durante cinco a sete dias por semana.

1.6.2. Condições da experiência

1.6.2.1. Animais de experiência

Podem ser utilizados ratos adultos, coelhos ou cobaias. Outras espécies poderão ser utilizadas mas a sua utilização deverá ser justificada.

No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar $\pm 20\%$ do peso médio apropriado.

1.6.2.2. Número e sexo

Para cada grupo de ensaio serão utilizados pelo menos 10 animais (cinco fêmeas e cinco machos) com pele saudável. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência, deve acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê vir a sacrificar. Para além destes, poderá haver um grupo satélite de 10 animais (cinco animais de cada sexo) tratado com a dose mais elevada durante 28 dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante 14 dias

após o tratamento. Utiliza-se também um grupo satélite de 10 animais de controlo (cinco animais de cada sexo).

1.6.2.3. Doses

São necessárias pelo menos três doses diferentes com um controlo ou com um veículo de controlo no caso de ser utilizado um veículo. O período de exposição deverá ser no mínimo de seis horas por dia. A substância de ensaio será aplicada diariamente à mesma hora e a quantidade a administrar será ajustada regularmente (semanal ou bissemanalmente) de modo a manter-se constante relativamente ao peso corporal do animal. Os animais do grupo de controlo serão tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de experiência, com excepção da aplicação da substância de ensaio. No caso de se utilizar um veículo para facilitar a administração, este será administrado ao grupo de controlo da mesma forma que aos grupos tratados, devendo a dose corresponder à do grupo tratado com a dose mais elevada. A dose mais elevada será determinada de forma a produzir efeitos tóxicos mas nunca, ou raramente, a morte do animal. A dose mais baixa não deverá produzir quaisquer efeitos tóxicos. No caso de se dispor de informação sobre a exposição humana, a dose mais baixa deverá exceder esse valor. O ideal seria a dose intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observado. No caso de se utilizar várias doses intermédias, a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos grupos das doses mais baixa e intermédia, assim como nos grupos de controlo, a incidência da mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

No caso de a aplicação da substância de ensaio provocar uma grave irritação cutânea, dever-se-á reduzir as concentrações, o que poderá originar uma diminuição ou até um desaparecimento dos outros efeitos tóxicos da dose mais elevada. Se as lesões cutâneas forem muito graves, pode tornar-se necessário interromper a experiência e recomeçá-la com concentrações mais fracas.

1.6.2.4. Teste limite

Se já tiver sido efectuada uma experiência preliminar com uma dose de 1 000 mg/kg ou com uma dose mais elevada em função da possibilidade de uma exposição humana conhecida, que não tenha provocado quaisquer efeitos tóxicos, será inútil prosseguir a experiência.

1.6.2.5. Período de observação

Os animais da experiência serão observados diariamente para se detectar manifestações de toxicidade. Proceder-se-á ao registo do momento da morte e do momento do aparecimento e do desaparecimento das manifestações de toxicidade.

1.6.3. Procedimento

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. Em condições ideais a substância de ensaio será administrada aos animais sete dias por semana durante um período de 28 dias. Os animais de todos os grupos satélite que forem objecto de observações complementares serão mantidos vivos durante mais 14 dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos. O tempo de exposição será pelo menos de seis horas por dia.

A substância de ensaio será aplicada uniformemente numa área equivalente a 10 % da superfície total do corpo. No caso de substâncias altamente tóxicas, a superfície a utilizar poderá ser menor mas a camada da substância deverá ser o mais fina e uniforme possível.

Durante a exposição a substância de ensaio é mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo antialérgico. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância de ensaio e de modo a evitar que os animais ingiram a referida substância. É possível utilizar aparelhos de contenção para evitar a ingestão da substância, mas não se recomenda a imobilização completa. Como alternativa pode utilizar-se uma «coleira de protecção».

No fim do tempo de exposição é necessário, se possível, eliminar todos os resíduos da substância utilizando água ou recorrendo a qualquer outro método adequado para limpeza da pele.

Os animais serão observados diariamente, registando-se sempre as manifestações de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e a sua duração. Proceder-se-á à observação das modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e do comportamento. Determinar-se-á semanalmente o peso dos animais. Recomenda-se também que se determine semanalmente o consumo alimentar. Deve observar-se regularmente os animais para se evitar perdas, tanto quanto possível, causadas por canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. No fim da experiência todos os animais sobreviventes dos grupos tratados não satélites serão autopsiados. Os animais moribundos e os animais que apresentem graves sintomas de angústia ou dor deverão ser imediatamente retirados, sacrificados e submetidos a autópsia.

Os exames a seguir enunciados deverão ser efectuados no fim do período de ensaio para todos os animais incluindo os controlos:

1. Um exame hematológico compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária, bem como um estudo sobre o potencial de coagulação.

2. A determinação de dados bioquímicos do sangue incluindo pelo menos um parâmetro da função hepática e renal: alanina aminotransferase (inicialmente conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica), aspartato aminotransferase (inicialmente conhecida como transaminase glutâmico-oxalo-acética), azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirrubina total e as proteínas séricas totais.

As outras análises eventualmente necessárias para uma avaliação toxicológica adequada incluem as análises de cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum, análises de lípidos, de hormonas, equilíbrio ácido-básico, meta-hemoglobina, e actividade colinesterásica.

Pode recorrer-se a outras análises bioquímicas clínicas sempre que necessário para melhorar a investigação dos efeitos observados.

1.6.4. Autópsia

Todos os animais submetidos a experiência deverão ser submetidos a uma autópsia geral. Pelo menos o fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos deverão ser pesados ainda húmidos, tão cedo quanto possível após a dissecação para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Todos os órgãos e tecidos, isto é, pele normal e tratada, fígado, rins, baço, testículos, glândulas supra-renais, coração e órgãos alvo (isto é, os órgãos que apresentem lesões graves ou variações de volume) deverão ser conservados num meio adequado para eventual exame histopatológico futuro.

1.6.5. Exame histopatológico

No grupo tratado com a dose mais elevada e no grupo de controlo deve efectuar-se o exame histológico dos órgãos e tecidos conservados. Os órgãos e tecidos que apresentem efeitos susceptíveis de serem atribuídos à substância de ensaio administrada na dose mais elevada deverão ser examinados em todos os grupos tratados com doses inferiores. Deve proceder-se a um exame histológico dos animais de qualquer grupo satélite com particular ênfase sobre os órgãos e tecidos que apresentaram efeitos identificados nos outros grupos tratados.

2. RESULTADOS

Os resultados serão resumidos na forma de quadros indicando, para cada experiência, o número de animais no início do ensaio e o número de animais que apresenta cada tipo de lesão. Todos os resultados observados deverão ser avaliados por um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

- dados sobre os animais (espécie, estirpe, origem, condições ambientais, dieta, etc.),
- condições experimentais (incluindo o tipo de cobertura: oclusiva ou não oclusiva),
- doses (incluindo o veículo, se utilizado) e concentrações,
- dose sem efeito, se possível,
- resposta tóxica por sexo e por dose,
- momento da morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,
- efeitos tóxicos ou outros,
- momento da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,
- dados relativos à alimentação e peso corporal,
- exames hematológicos efectuados e resultados,
- provas bioquímicas clínicas utilizadas e seus resultados,
- resultados da autópsia,
- descrição pormenorizada de todos os resultados histopatológicos,
- tratamento estatístico dos resultados, se possível,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver introdução geral, parte B (ponto D).

4. REFERÊNCIAS

Ver introdução geral, parte B (ponto E).

B.10. MUTAGENICIDADE - ENSAIO *IN VITRO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS

EM MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 473 - Ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas em mamíferos (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas é identificar os agentes que causam aberrações estruturais dos cromossomas em culturas de células de mamíferos (1) (2) (3). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, afectando os cromossomas ou os cromatídeos. A maior parte dos mutagénicos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. Um aumento da taxa de poliploidia pode indicar que um determinado produto químico tem potencial para induzir aberrações numéricas. Contudo, este método não foi concebido para medir as aberrações numéricas nem é normalmente utilizado com esse objectivo. As mutações nos cromossomas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as alterações que causam nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas estão envolvidas na indução de cancro nos seres humanos e em animais utilizados em experiências.

O ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas pode envolver culturas de linhas celulares bem estabelecidas, de uma determinada estirpe ou ainda culturas de células primárias. As células utilizadas são seleccionadas com base na sua capacidade de crescimento em cultura, na estabilidade do cariótipo, no número e diversidade dos seus cromossomas e na frequência das aberrações cromossómicas espontâneas.

Os ensaios *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica, que não consegue imitar inteiramente as condições *in-vivo* nos mamíferos. Dever ter-se o cuidado de evitar condições que conduzam a resultados positivos que não sejam reflexo de uma mutagenicidade intrínseca mas que possam resultar, por exemplo, de mudanças do pH, da pressão osmótica ou ainda de níveis elevados de citotoxicidade (4) (5).

O presente ensaio é utilizado para a análise de agentes eventualmente mutagénicos ou carcinogénicos para os mamíferos. Muitos dos compostos que dão um resultado positivo no presente ensaio são carcinogénicos nos mamíferos, não existindo, contudo, uma correlação perfeita entre o ensaio e a carcinogenicidade. A correlação depende da classe química e existem cada vez mais provas de que alguns agentes carcinogénicos não são detectados por este ensaio, por os seus mecanismos de actuação não passarem directamente pela danificação do ADN.

Ver também a Parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

Endoreduplicação: processo mediante o qual, na sequência de um período S de replicação do ADN, o núcleo não sofre mitose, iniciando-se um novo período S, que resulta em cromossomas com 4, 8, 16, ... cromátídeos.

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

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

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico das células utilizadas.

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haplóide (n), mas diferente do número diplóide (ou seja, $3n$, $4n$, etc.).

Aberração estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detectável por exame microscópico das células em metafase, na forma de supressão de segmentos, de alterações de partes da sequência ou da troca de segmentos num cromátídeo ou entre cromátídeos.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As culturas celulares são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Após um período determinado, adiciona-se um produto fixador da metafase (p.ex.: Colcemid® ou colchicina); as células são colhidas, coradas e analisadas microscopicamente para detectar a presença de aberrações cromossómicas nas células em metafase.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. Preparação

1.4.1.1. Células

Podem utilizar-se diversas linhas celulares, estirpes ou culturas celulares primárias, incluindo células humanas (p.ex.: fibroblastos do *hamster* da China ou linfócitos da circulação periférica do ser humano ou de outros mamíferos).

1.4.1.2. Meios e condições de cultura

As culturas devem ser mantidas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, concentração de CO_2 , temperatura e humidade). As linhas celulares e estirpes devem ser periodicamente controladas no que respeita à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasma, não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas. Deve ser conhecida a duração do ciclo celular normal para as células e condições de cultura utilizadas.

1.4.1.3. *Preparação das culturas*

Linhas e estirpes de células definidas: multiplicam-se as células provenientes de culturas de arranque por incubação a 37°C num meio cuja densidade não permita a confluência das culturas antes da colheita.

Linfócitos: adiciona-se sangue total tratado com anticoagulante (p.ex.: heparina) ou linfócitos provenientes de indivíduos saudáveis a um meio de cultura contendo um agente mitogénico (p.ex.: fitohemaglutinina), incubando a 37°C.

1.4.1.4. *Activação metabólica*

As células devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais geralmente utilizado consiste numa fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) ou uma mistura de fenobarbitona e β -naftoflavona (10) (11) (12).

A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama dos 1-10% v/v no meio de ensaio final. O estado do sistema de activação metabólica pode depender da classe dos produtos químicos em estudo. Em alguns casos pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações diferentes de fracção pós-mitocondrial.

Progressos tais como a elaboração por engenharia genética de linhas celulares que expressem enzimas de activação específicas oferecem possibilidades de activação endógena. A escolha das linhas celulares a utilizar terá de ser cientificamente justificada (p.ex.: pela relevância do isoenzima de citocromo P450 para o metabolismo da substância em estudo).

1.4.1.5. *Substância em estudo/Preparação*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem adicionadas às células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/Veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros. A água poderá ser removida através de um filtro molecular.

1.4.2.2. *Concentrações de exposição*

A citotoxicidade, a solubilidade no sistema de ensaio e as alterações do pH ou da pressão osmótica constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação da concentração máxima.

A citotoxicidade deve ser determinada na experiência principal tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica, por recurso a um indicador adequado da integridade e do crescimento celulares, nomeadamente o grau de confluência, as contagens de células viáveis ou o índice mitótico. Poderá ser útil determinar previamente a citotoxicidade e solubilidade através de uma experiência preliminar.

Devem utilizar-se pelo menos três concentrações analisáveis. No caso de substâncias que sejam citotóxicas, as concentrações utilizadas devem abranger uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou nula; o que significa geralmente que as concentrações devem variar num factor de 2 a $\sqrt{10}$. No momento da colheita, a concentração máxima deve determinar uma redução significativa (superior a 50%) do grau de confluência, da contagem de células viáveis e do índice mitótico. O índice mitótico constitui uma medida indirecta dos efeitos citotóxicos/citostáticos, dependendo do tempo decorrido após a exposição. Todavia, a sua utilização é aceitável no caso de culturas em suspensão, em que os restantes métodos de determinação da toxicidade podem revelar-se fastidiosos ou impraticáveis. Os dados relativos à cinética do ciclo celular, nomeadamente o tempo médio de geração (TMG), podem ser utilizados como informação suplementar. O TMG constitui, no entanto, uma média global, que nem sempre permite identificar a existência de sub populações com um crescimento menos rápido, podendo acontecer em alguns casos que ligeiros aumentos do TMG possam resultar em atrasos muito substanciais no que respeita ao surgimento de aberrações.

No caso de substâncias sem efeitos citotóxicos consideráveis, a concentração máxima do ensaio deve ser a mais baixa de 5 μ l/ml, 5 mg/ml ou 0,01 M.

Para substâncias relativamente insolúveis que não sejam tóxicas em concentrações inferiores à concentração insolúvel, a dose máxima a utilizar deve corresponder a uma concentração acima do limite de solubilidade no meio de cultura final após o período de exposição. Em alguns casos (p.ex.: quando a toxicidade apenas ocorre em concentrações superiores à menor concentração insolúvel) é conveniente ensaiar mais de uma concentração com precipitação visível. Poderá ser útil avaliar a solubilidade no início e no fim da exposição, uma vez que a mesma se pode alterar durante a exposição no sistema de ensaio devido à presença de células, de S9, de soro, etc. A insolubilidade pode ser detectada à vista desarmada. O precipitado não deve interferir com as contagens necessárias.

1.4.2.3. *Controlos negativos e positivos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo), tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Quando for utilizada activação metabólica, o produto químico de controlo positivo deve ser o mesmo que exige a activação para dar uma resposta mutagénica.

Para os controlos positivos deve ser utilizado um agente clastogénico conhecido aos níveis de exposição esperados, de forma a obter um aumento detectável e reprodutível ao longo do tempo que permita demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio.

As concentrações do controlo positivo devem ser escolhidas de modo a que os seus efeitos sejam claros, devendo ser utilizadas lâminas codificadas de forma a que não sejam imediatamente identificáveis pela pessoa que procede à leitura. As substâncias de controlo positivo podem ser, por exemplo:

Condição de activação metabólica	Substância	Nº CAS	Nº EINECS
Ausência de activação metabólica exógena	Metanosulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
	Etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
	N-óxido de 4-Nitroquinolina	56-57-5	200-281-1
Presença de activação metabólica exógena	Benzo[<i>a</i>]pireno	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
	Ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	

Podem utilizar-se no controlo positivo outras substâncias adequadas. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe afim para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam.

Para cada colheita, devem também realizar-se controlos negativos, em que as células são expostas apenas ao solvente ou veículo e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

1.4.3. Procedimento

1.4.3.1. Exposição à substância em estudo

As células em crescimento são expostas à substância em estudo na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica. Os linfócitos devem ser expostos à substância em estudo cerca de 48 horas após o estímulo mitogénico.

1.4.3.2. Normalmente, devem ser utilizadas culturas em duplicado para cada concentração, sendo fortemente recomendada a utilização de culturas em duplicado também para os controlos negativos/solventes. Quando puder ser demonstrado, a partir dos dados de experiências anteriores, que a diferença entre as culturas duplicadas é mínima (13) (14), pode aceitar-se a utilização de uma única cultura para cada concentração.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (15) (16).

1.4.3.3. *Intervalo de amostragem das culturas*

No primeiro ensaio, as células são expostas à substância em estudo, na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica, durante 3-6 horas, sendo colhidas a intervalos equivalentes a cerca de 1,5 ciclos celulares normais, a partir do início da exposição (12). Se este protocolo der resultados negativos tanto na presença como na ausência de um sistema de activação, deve ser realizada uma experiência adicional sem activação, com exposição em contínuo até à colheita, passado um tempo equivalente a 1,5 ciclos celulares normais. Certos produtos químicos podem ser detectados mais facilmente com tempos de exposição/colheita superiores a 1,5 ciclos celulares. Os resultados negativos com activação metabólica terão de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação.

1.4.3.4. *Preparação dos cromossomas*

As culturas de célula são tratadas com Colcemid® ou colchicina, geralmente durante 1-3 horas antes da colheita. procede-se à colheita individual das culturas e ao respectivo processamento, com vista à preparação dos cromossomas, que inclui o tratamento hipotónico das células, seguido de fixação e coração.

1.4.3.5. *Análise*

Todas as lâminas, incluindo as provenientes dos lotes de controlo positivo e negativo, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os processos de fixação dão frequentemente lugar à ruptura de uma determinada proporção das células em metafase, com perda dos cromossomas, as células contabilizadas devem apresentar, para todos os tipos de célula, um número de centrómeros igual ao número modal ± 2 . Devem ser contabilizadas pelo menos 200 metafases com uma boa distribuição para cada concentração e para o controlo, com boa concordância entre os replicados, quando existam. Esse número pode ser inferior caso se observe um número elevado de aberrações.

Embora o objectivo do ensaio consista na detecção de aberrações cromossómicas estruturais, devem registar-se os casos de poliploidia e de endoreduplicação, quando ocorram.

2. **DADOS**

2.1. **TRATAMENTO DOS RESULTADOS**

A unidade experimental é a célula, pelo que se deve avaliar a percentagem de células que apresentam uma aberração cromossómica estrutural. Os diferentes tipos diferentes de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados e discriminados pelo seu número e frequência nas culturas experimentais e de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações.

Durante a experiência principal para a detecção de aberrações, devem ser igualmente registadas as medições da citotoxicidade realizadas em paralelo com os ensaios, para todas as culturas de controlo e para os casos de resposta negativa.

Devem ser fornecidos dados individuais para cada cultura, para além de um quadro com o resumo dos dados globais.

Não é necessário comprovar uma reacção positiva inequívoca. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de experiências adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais. A necessidade de confirmar os resultados negativos já foi discutida no ponto 1.4.3.3. As experiências subsequentes devem contemplar a modificação dos parâmetros de estudo, por forma a alargar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros de estudo que podem ser alterados incluem a gama e os intervalos entre as diferentes concentrações e as condições da activação metabólica.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Existem vários critérios para determinar um resultado positivo, nomeadamente o aumento do número de células com aberrações cromossómicas relacionado com a concentração ou que seja reprodutível. Deve atender-se, antes de mais, à importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (3) (13), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva.

Um aumento do número de células poliplóides pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a mitose e de induzir aberrações cromossómicas numéricas. Um aumento do número de células com cromossomas endoreduplicados pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a progressão do ciclo celular (17) (18).

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios supra é considerada não-mutagénica para o sistema em causa.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas indica que a substância em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais nas células somáticas de mamíferos em cultura. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células somáticas de mamíferos em cultura.

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

- justificação para a escolha do veículo
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida;

Células:

- tipo e origem das células;
- características do cariótipo e adequação do tipo de células utilizado;
- ausência de micoplasma, quando aplicável;
- informação sobre a duração do ciclo celular;
- sexo dos dadores de sangue, sangue completo ou linfócitos, agente mitogénico utilizado;
- número de passagens, quando aplicável;
- métodos de manutenção da cultura celular, quando aplicável;
- número modal de cromossomas.

Condições de ensaio:

- identificação e concentração da substância que pára a metafase, duração da exposição da célula;
- justificação para a selecção das concentrações e do número de culturas, incluindo, p.ex., dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade, quando disponíveis;
- concentração da substância em estudo;
- volumes adicionados do veículo e da substância em estudo;
- temperatura de incubação;
- tempo de incubação;
- duração da exposição;
- densidade celular da cultura de arranque, quando aplicável;
- tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade;
- controlos positivos e negativos;
- métodos de preparação das lâminas;
- critérios de contabilização das aberrações;
- número de células em metafase analisadas;
- métodos de determinação da toxicidade;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;

Resultados:

- sinais de toxicidade, ou seja, grau de confluência, dados relativos ao ciclo celular, contagens de células, índice mitótico;
- sinais de precipitação;
- dados sobre o pH e a pressão osmótica do meio de tratamento, caso tenham sido determinados;
- definição das aberrações observadas, incluindo as lacunas;
- número de células em que se observa uma aberração cromossômica e tipo dessas aberrações, discriminados para cada cultura exposta e de controle;
- alterações da ploidia, quando observadas;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos ao controlo negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio;
- dados históricos sobre o controlo negativo (solvente/veículo) e positivo, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4.

BIBLIOGRAFIA

1. Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
2. Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The *in Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427-432.
3. Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), 1-175.
4. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
5. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.

6. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
7. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
8. Natarajan, A.T., Tate, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
9. Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66, 277-290.
10. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
11. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
12. Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, 241-261.
13. Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
14. Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). replicated Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, 139-149.
15. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCoey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
16. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
17. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.
18. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

B.11. MUTAGENICIDADE - ENSAIO *IN VIVO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM

CÉLULAS DA MEDULA DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 475 - Ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos é utilizado para a detecção de aberrações cromossómicas estruturais induzidas pela substância em estudo em células da medula de animais, geralmente roedores (1) (2) (3) (4). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, afectando os cromossomas ou os cromátídeos. A maior parte dos mutagénicos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. Um aumento da taxa de poliploidia pode indicar que um determinado produto químico tem potencial para induzir aberrações numéricas. As mutações cromossómicas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as alterações que causam nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas estão envolvidas na indução de cancro nos seres humanos e em animais utilizados em experiências.

Os animais utilizados no presente ensaio são geralmente roedores. A medula é o tecido objectivo do ensaio, por se tratar de um tecido altamente vascularizado e que contém uma população de células com grande ritmo de duplicação e que podem ser facilmente isoladas e processadas. O presente método não se destina à aplicação noutras espécies animais ou tecidos objectivo.

O presente ensaio de aberrações cromossómicas é particularmente relevante para a avaliação dos riscos mutagénicos, uma vez que permite tomar em consideração os factores do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN, embora estes possam variar de espécie para espécie e de tecido para tecido. Os ensaios *in vivo* são igualmente úteis para a investigação complementar de efeitos mutagénicos detectado através de ensaios *in vitro*.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

Ver também a Parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

Endoreduplicação: processo no qual, após um período S de replicação do ADN, o núcleo não entra em mitose, iniciando um novo período S. O resultado são cromossomas com 4, 8, 16, ... cromátídeos.

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico das células utilizadas.

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haplóide (n), mas diferente do número diplóide (ou seja, 3n, 4n, etc.).

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais são expostos à substância em estudo através de um modo de exposição apropriado, sendo sacrificados passado o tempo necessário após a exposição. Antes do sacrifício, os animais são tratados com um produto fixador da metafase (p.ex.: colchicina ou Colcemid®). Seguidamente, são feitas preparações de cromossomas a partir das células de medula onde, após coração, as células em metafase são analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Seleção das espécies animais*

Geralmente, são utilizados ratos, ratazanas ou hamster chineses, embora possa ser utilizada qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a variação de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder $\pm 20\%$ do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, Parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50-60%.

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias.

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem adicionadas às células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do Ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/Veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo nem produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos.

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo) para cada sexo. Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir aberrações estruturais *in vivo* aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. A dose a administrar para o controlo positivo deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Substância	Nº CAS	Nº EINECS
Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
Etil ntrosureia	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
Trietilenolamina	51-18-3	200-083-5

Para cada colheita, devem também realizar-se controlos negativos, em que os animais são expostos apenas ao solvente ou veículo, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Se só estiver prevista uma amostra dos controlos negativos, a altura mais apropriada é a primeira amostra. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de estudos anteriores ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. Número e sexo dos animais

Cada grupo de estudo e de controlo deve incluir pelo menos 5 animais analisáveis por sexo. Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial da toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2. Programação do tratamento

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa única exposição, podendo igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes. Qualquer outro regime de administração terá de ser cientificamente justificado.

Devem ser colhidas duas amostras separadas, após exposição durante um dia. Para os roedores, a primeira amostra deve ser colhida 1,5 ciclos celulares normais (que é normalmente de 12-18 h) após a exposição. Dado que o tempo necessário para a absorção e metabolismo da substância em estudo, bem como o seu efeito sobre a cinética do ciclo celular, podem afectar o momento óptimo para a detecção de uma eventual aberração cromossómica, recomenda-se a recolha de uma segunda amostra 24 h após a primeira. Se forem utilizados regimes de administração ao longo de mais de um dia, deve ser colhida uma amostra 1,5 ciclos celulares normais após a exposição final.

Antes do sacrifício, os animais são injectados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um agente de fixação da metafase (p.ex.: Colcemid® ou colchicina). As amostras serão colhidas a intervalos regulares, correspondentes a aproximadamente 3-5 horas para os ratos e a 4-5 horas para os hamster chineses, a partir desse momento. As células da medula são colhidas e analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.5.3. **Doses**

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal (5). Se a substância for tóxica, deverão ser utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem, abrangendo uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose máxima, que é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não-tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas numa base casuística. A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que produz algumas indicações de toxicidade na medula (p.ex.: uma redução superior a 50% do índice mitótico).

1.5.4. **Ensaio limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se, com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, não for previsível a existência de toxicidade genética, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. Para os estudos de maior duração, a dose limite é de 2000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de até 14 dias e de 1000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de duração superior a 14 dias. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injeção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injeção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante e independente da dose a administrar.

1.5.6. **Preparação dos cromossomas**

Imediatamente após o sacrifício, a medula é colhida, exposta a uma solução hipotónica e fixada. As células são depois esfregadas em lâminas e coradas.

1.5.7. **Análise**

O índice mitótico deve ser determinado como medição da citotoxicidade em pelo menos 1000 células por animal para todos os animais expostos à substância em estudo (incluindo os controles positivos) e para os animais não expostos do controlo negativo.

Devem ser analisadas pelo menos 100 células de cada animal. Este número poderá ser menor quando se verificarem taxas elevadas de aberrações. Todas as lâminas, incluindo as provenientes dos lotes de controlo positivo e negativo, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os processos de fixação dão frequentemente lugar à ruptura de uma determinada proporção das células em metafase, com perda dos cromossomas, as células contabilizadas devem apresentar, para todos os tipos de célula, um número de centrómeros igual ao número modal ± 2 .

2. **DADOS**

2.1. **TRATAMENTO DOS RESULTADOS**

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal, devem ser apresentados o número de células contabilizadas, o número de aberrações por célula e a percentagem de células com aberrações cromossómicas estruturais. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados, com os respectivos números e frequências, para os grupos expostos à substância em estudo e para os grupos de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações. Se não houver qualquer evidência de uma diferença na resposta entre os sexos, os dados de ambos os sexos poderão ser combinados para fins estatísticos.

2.2. **AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

Existem vários critérios para determinar um resultado positivo, nomeadamente o aumento do número de células com aberrações cromossómicas relacionado com a concentração ou um claro aumento do número de células com aberrações num determinado grupo ou numa determinada amostra. Deve atender-se, antes de mais, à importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (3) (13), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Um aumento do número de células poliplóides pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a mitose e de induzir aberrações cromossómicas numéricas. Um aumento do número de células com cromossomas endoreduplicados pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a progressão do ciclo celular (7) (8).

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios supra no presente ensaio é considerada não-mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas indica que a substância em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais nas células da medula das espécies testadas. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células da medula das espécies testadas.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

- justificação para a escolha do veículo
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida;

Animais de ensaio:

- espécie/linha celular utilizada;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo;

Condições de ensaio:

- controlos positivos e negativos (veículo/solvente);
- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado;
- justificação para a selecção das doses;
- preparação da substância em estudo;
- modo de administração da substância em estudo;
- justificação da via de administração escolhida;
- método para a verificação de que a substância em estudo atingiu a circulação geral ou o tecido objectivo, quando aplicável;
- conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável;
- qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada dos calendários de exposição e amostragem;
- métodos de medição da toxicidade;
- substância utilizada para fixar a metafase, respectiva concentração e duração da exposição;
- métodos de preparação das lâminas;
- critérios de contabilização das aberrações;
- número de células analisadas por animal;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- índice mitótico;
- tipo e número de aberrações observadas em cada animal;
- número total de aberrações em cada grupo, com as respectivas médias e desvios-padrão;
- número de células aberrantes em cada grupo, com as respectivas médias e desvios-padrão;
- alterações da ploidia, quando observadas;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio;
- dados históricos sobre o controlo negativo com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão;
- dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
2. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res.*, 189, 157-165.
3. Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
4. Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, 312, 305-312.
5. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
6. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.
7. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.* 119, 403-413.
8. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

B. 12. MUTAGENICIDADE – ENSAIO *IN-VIVO* DOS MICRONÚCLEOS

EM ERITRÓCITOS DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 474 - Ensaio dos micronúcleos em eritrócitos de mamíferos (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio *in-vivo* dos micronúcleos de mamíferos é utilizado para a detecção de danos induzidos pela substância em estudo nos cromossomas ou no aparelho mitótico dos eritroblastos, através da análise dos eritrócitos retirados da medula e/ou de células de sangue periférico de animais, geralmente roedores.

O objectivo do ensaio do micronúcleo é identificar substâncias que causam danos citogénicos, dando lugar à formação de micronúcleos com fragmentos de cromossoma ou com cromossomas inteiros.

Quando um eritroblasto da medula se desenvolve para dar um eritrócito policromático, o núcleo principal é expulso; qualquer micronúcleo que tenha sido formado pode “ficar para atrás” (*lagging*), no citoplasma, onde não deveria existir qualquer material nuclear. A visualização dos micronúcleos é facilitada nestas células, uma vez que não existe um núcleo principal. Um aumento da frequência de eritrócitos policromáticos, micronucleados, nos animais expostos à substância em estudo representa uma indicação de danos cromossómicos induzidos.

Para o presente ensaio utiliza-se normalmente a medula de roedores, uma vez que os eritrócitos policromáticos são produzidos nesse tecido. A medição dos eritrócitos (policromáticos) imaturos micronucleados no sangue periférico é igualmente aceitável para qualquer outra espécie em que tenha sido demonstrado que o baço não tem a capacidade de eliminar os eritrócitos micronucleados ou que apresente uma sensibilidade adequada para a detecção de agentes que causam aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas. Os micronúcleos podem ser distinguidos por alguns critérios, que incluem a identificação da presença ou ausência de um centrómero ou de ADN centromérico nos micronúcleos. A frequência dos eritrócitos (policromáticos) imaturos micronucleados é o principal ponto final utilizado. A proporção de eritrócitos (normocromáticos) maduros com micronúcleos no sangue periférico pode igualmente ser utilizada como ponto final do ensaio, quando os animais forem expostos à substância em estudo de forma contínua durante 4 semanas ou mais.

O ensaio *in-vivo* do micronúcleo de mamíferos é particularmente relevante para a avaliação dos perigos mutagénicos, uma vez que permite a avaliação dos elementos metabólicos, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN *in vivo*, embora estes possam variar de espécie para espécie, de tecido para tecido e em termos do ponto final genético. Os ensaios *in-vivo* são igualmente úteis para a investigação suplementar de um efeito mutagénico detectado *in vitro*.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

Ver também a Parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Centrómero: Região(ões) de um cromossoma a que estão associadas fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento ordeiro dos cromossomas para os pólos da célula.

Micronúcleos: Pequenos núcleos separados e adicionais dos núcleos das células principais, produzidos durante a telefase da mitose (meiose) por fragmentos de cromossoma ou cromossomas inteiros que “ficam para trás” (*lagging*).

Eritrócito Normocromático: Eritrócito maturo a que faltam ribossomas e que pode, por conseguinte, distinguir-se dos eritrócitos policromáticos imaturos por coração selectiva dos ribossomas.

Eritrócito policromático: Eritrócito imaturo, numa fase de desenvolvimento intermediária, que ainda contém ribossomas e pode, por conseguinte, distinguir-se dos eritrócitos normocromáticos maturos por coração selectiva dos ribossomas.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais são expostos à substância em estudo por uma via apropriada. Se for utilizada a medula, os animais são sacrificados passado o tempo necessário após a exposição, a medula é extraída e são feitas preparações coradas (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Quando é utilizado o sangue periférico, o sangue é recolhido passado o tempo necessário após a exposição e são preparados esfregaços corados (4) (8) (9) (10). Nos estudos com sangue periférico, as amostras de célula devem ser colhidas tão cedo quanto possível após a última exposição à substância em estudo. As preparações são analisadas para a presença de micronúcleos.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. Preparação

1.4.1.1. *Seleção das espécies animais*

Quando se pretender utilizar preparações da medula, recomenda-se a utilização de ratos, embora possa ser utilizada qualquer espécie de mamífero que seja apropriada. Quando se utilizar o sangue periférico, recomenda-se a utilização de ratos. Contudo, pode ser utilizada, qualquer espécie de mamífero que seja apropriada, desde que se trate de uma espécie em que o baço não remove os eritrócitos micronucleados ou que apresente uma sensibilidade adequada para a detecção de agentes que causam aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas. Devem ser utilizados animais saudáveis jovens de linhas de laboratório com características bem conhecidas. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder \pm 20% do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, Parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50-60%.

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados.

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do Ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/Veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo nem produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos.

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo) para cada sexo. Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir micronúcleos *in vivo* aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. A dose de controlo positivo a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Substância	Nº CAS	Nº EINECS
Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
Etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
Trietilenolamina	51-18-3	200-083-5

Para cada colheita, devem também realizar-se controlos negativos, em que os animais são expostos apenas ao solvente ou veículo, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Se só estiver prevista uma amostra dos controlos negativos, a altura mais apropriada é a primeira amostra. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de estudos anteriores ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

Se for utilizado o sangue periférico, uma amostra anterior à exposição poderá servir para o controlo negativo, mas apenas nos estudos de menor duração (ou seja, 1 a 3 exposições), desde que os dados respeitantes a essa amostra estejam de acordo com o esperado em função de experiências anteriores.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. Número e sexo dos animais

Cada grupo exposto e de controlo deve incluir pelo menos 5 animais analisáveis por sexo (11). Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial da toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2. Programação do tratamento

Não é possível recomendar qualquer programação específica para a exposição (ou seja, 1, 2 ou mais exposições com intervalos de 24 h). As amostras recolhidas durante regimes de administração prolongada são aceitáveis, desde que o estudo demonstre a existência de um efeito positivo ou, para um estudo negativo, desde que a toxicidade seja demonstrada ou que se utilize uma dose-limite, com administração até ao momento da colheita. As substâncias de ensaio podem igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia, separados por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes.

O ensaio pode ser executado de duas formas:

- a) Os animais são expostos à substância em estudo uma única vez. As amostras de medula são colhidas pelo menos duas vezes, a primeira das quais pelo menos 24 horas após a exposição, com intervalos apropriados entre as colheitas mas não ultrapassando as 48 horas após a exposição. Uma eventual colheita antes de 24 horas após a exposição terá de ser justificada. As amostras de sangue periférico são colhidas pelo menos duas vezes, a primeira das quais pelo menos 36 horas após a exposição, com intervalos apropriados entre as colheitas mas não ultrapassando as 72 horas após a exposição. Quando for identificada uma resposta positiva numa determinada colheita, não será necessário continuar o estudo.
- b) Se forem utilizados 2 ou mais exposições diárias (p.ex.: duas ou mais exposições com intervalos de 24 horas), a primeira amostra deve ser colhida 18 a 24 horas depois da exposição final no caso da medula e 36 a 48 horas depois da exposição final no caso do sangue periférico (12).

Quando necessário, poderão ser recolhidas amostras adicionais.

1.5.3. **Doses**

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal (13). Se a substância for tóxica, deverão ser utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem, abrangendo uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose máxima, que é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. As substâncias com atividade biológica específica em doses baixas e não-tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas numa base casuística. A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que produz algumas indicações de toxicidade na medula (p.ex.: redução da proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais na medula ou no sangue periférico).

1.5.4. **Ensaio limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se, com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, não for previsível a existência de toxicidade genética, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. Para os estudos de maior duração, a dose limite é de 2000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de até 14 dias e de 1000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de duração superior a 14 dias. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injeção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injeção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante e independente da dose a administrar.

1.5.6. **Preparação da medula / sangue**

As células da medula são retiradas do fémur ou da tibia imediatamente após o sacrifício. Geralmente, as células são retiradas do fémur ou da tibia, preparadas e coradas de acordo com métodos já definidos. O sangue periférico é retirado da veia caudal ou de outro vaso sanguíneo apropriado. As células de sangue são imediatamente sujeitas a uma coração supravital (8) (9) (10) ou então são preparados esfregaços que depois são corados. A utilização de uma coração específica para o ADN [p.ex.: laranja de acridina (14) ou pironina-y de milho 33258 plus da Hoechst(15)] pode eliminar alguns dos erros associados à utilização de uma coração não específica para o ADN. Esta vantagem não impossibilita a utilização de corações convencionais (p.ex.: Giemsa). Outros sistemas [p.ex.: colunas de celulose para remoção das células nucleadas (16)] podem igualmente ser utilizados, desde que se demonstre que esses sistemas funcionam de forma adequada para a preparação de micronúcleos em laboratório.

1.5.7. **Análise**

A proporção de eritrócitos imaturo em relação aos eritrócitos totais (imaturos + maduros) é determinada para cada animal, através da contagem de pelo menos 200 eritrócitos no caso da medula e de 1000 eritrócitos no caso do sangue periférico (17). Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser codificadas independentemente antes da análise microscópica. A eventual ocorrência de eritrócitos imaturos micronucleados deve ser analisada em pelo menos 2000 eritrócitos imaturos por animal. A contagem de eritrócitos maduros micronucleados poderá ser utilizada como informação adicional. Ao analisar as lâminas, a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais não deve ser inferior a 20% do valor de controlo. Quando os animais forem sujeitos a uma exposição contínua durante 4 semanas ou mais, poderão ser também analisados 2000 eritrócitos maduros por animal, para determinação da ocorrência de micronúcleos. Os sistemas automatizados de análise (tratamento de imagens e citometria de fluxo em suspensões celulares) são alternativas aceitáveis à avaliação manual, se apropriadamente justificadas e validadas.

2. **DADOS**

2.1. **TRATAMENTO DOS RESULTADOS**

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal, devem ser verificados separadamente o número de eritrócitos imaturos, o número de eritrócitos imaturos micronucleados e a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais. Quando os animais tiverem sido expostos à substância em estudo em contínuo durante 4 semanas ou mais, devem também ser recolhidos dados em relação aos eritrócitos maduros. Para cada animal, deve ser apresentada a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais e, se for considerado necessário, de eritrócitos maduros micronucleados. Se não houver qualquer evidência de uma diferença na resposta entre os sexos, os dados de ambos os sexos poderão ser combinados para fins estatísticos.

2.2. **AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, como por exemplo um aumento do número de células micronucleadas relacionado com a dose ou um claro aumento do número de células micronucleadas num determinado grupo e numa determinada amostragem. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (18) (19), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não-mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio dos micronúcleos indica que a substância em estudo induz a ocorrência dos mesmos, como resultado de danos nos cromossomas ou no sistema mitótico dos eritroblastos da espécie testada. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz a ocorrência de micronúcleos nos eritroblastos imaturos da espécie testada.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

- justificação para a escolha do veículo
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida;

Animais de ensaio:

- espécie/linha celular utilizada;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo;

Condições de ensaio:

- controlos positivos e negativos (veículo/solvente);
- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado;
- justificação para a selecção das doses;
- preparação da substância em estudo;
- modo de administração da substância em estudo;
- justificação da via de administração escolhida;
- método para a verificação de que a substância em estudo atingiu a circulação geral ou o tecido objectivo, quando aplicável;
- conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável;
- qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada dos calendários de exposição e amostragem;
- métodos de preparação das lâminas;
- métodos de medição da toxicidade;
- critérios de contabilização dos eritrócitos imaturos micronucleados;
- número de células analisadas por animal;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais;
- número de eritrócitos imaturos micronucleados em cada animal;
- médias e desvios-padrão dos eritrócitos imaturos micronucleados por grupo;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística e respectivo método;
- dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio e dados históricos sobre o controlo negativo;
- dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4.

BIBLIOGRAFIA

1. Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, 187-190.
2. Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, 9-15.
3. Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* 123: 61-118.
4. Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, 29-80.
5. MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: "Developments in Science and Practice of Toxicology", Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 555-558.
6. MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. *Mutation Res.* 189: 103-112.
7. MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14: 513-522.
8. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. *Mutation Res.*, 245, 245-249.
9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. *Mutation Res.*, 278, 83-98.

10. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 153-159.
11. Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, 293-304.
12. Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 313-319.
13. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
14. Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, 241-247.
15. MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.*, 120, 269-275.
16. Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, 91-104.
17. Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to Normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, 97-99.
18. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
19. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 13/14 MUTAGENICIDADE - ENSAIO DE MUTAÇÃO REVERSA EM BACTÉRIAS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 471 - Ensaio de mutação reversa bacteriana (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de mutação reversa bacteriana utiliza estirpes de *Salmonelas typhimurium* e *Escherichia coli* carentes em aminoácidos para detectar mutações pontuais, causadas pela substituição, adição ou supressão de um ou mais pares de bases do ADN (1) (2) (3). O princípio do presente ensaio de mutação reversa bacteriana é a detecção de mutações que invertem as mutações existentes nas estirpes de ensaio, restaurando a capacidade funcional das bactérias sintetizarem um ácido essencial. As bactérias com mutação reversa são detectadas pela sua capacidade de crescimento na ausência do aminoácido em que as estirpes de ensaio eram carentes.

As mutações pontuais causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as mutações pontuais em oncogenes e em genes supressores de tumores nas células somáticas estão envolvidas na formação de tumores nos seres humanos e em animais experimentais. O ensaio de mutação reversa bacteriana é rápido, barato e relativamente fácil de execução. Muitas das estirpes de ensaio têm diversas características que as tornam mais sensíveis para a detecção de mutações, nomeadamente sequências de ADN identificativas dos locais de inversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas e eliminação ou aumento da ocorrência de erros nos processos de reparação do ADN. A especificidade das estirpes de ensaio pode fornecer alguma informação útil sobre os tipos de mutações induzidos pelos agentes genotóxicos. Já existe uma grande base de dados com resultados respeitantes a uma vasta gama de ensaios de mutação reversa bacteriana, tendo sido desenvolvidas metodologias com características bem conhecidas e que utilizam produtos químicos com diferentes propriedades físico-químicas, nomeadamente compostos temporários.

Ver também a Parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Ensaio de mutação reversa com *Salmonelas typhimurium* ou *Escherichia coli*: detecta mutações em estirpes carentes num determinado aminoácido (histidina ou triptofano, respectivamente), que tem como resultado a produção de uma estirpe independente do abastecimento externo desse aminoácido.

Mutagéneos de substituição de um par de bases são os agentes que causam uma alteração das bases do ADN. No ensaio de mutação reversa essa alteração pode ocorrer no local da mutação original ou num local diferente do genoma bacteriano.

Mutagéneos por deslocação do quadro de leitura são agentes que causam a adição ou supressão de um ou mais pares de bases no ADN, modificando dessa forma o quadro de leitura do ARN.

1.3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O ensaio de mutação reversa bacteriana utiliza células procariotas, que diferem das células de mamífero em características como a absorção, metabolismo, estrutura dos cromossomas e processos de reparação do ADN. Os ensaios conduzidos *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica. Os sistemas de activação metabólica *in vitro* não reproduzem inteiramente as condições *in-vivo* nos mamíferos. O ensaio não fornece, por conseguinte, informação directa sobre a potência mutagénica e carcinogénica da substância nos mamíferos.

O ensaio de mutação reversa bacteriana é geralmente utilizado para a despistagem inicial da actividade genotóxica e, nomeadamente, para detectar a indução de mutações pontuais. Uma extensa base de dados demonstrou que muitos produtos químicos que dão resultados positivos no presente ensaio apresentam uma actividade mutagénica noutros ensaios. Há exemplos de agentes mutagénicos que não são detectados pelo presente ensaio, podendo as razões para essas falhas ser atribuídas à natureza específica do ponto final detectado, a diferenças na activação metabólica ou ainda a diferenças na biodisponibilidade. Por outro lado, elementos que aumentem a sensibilidade do ensaio de mutação reversa bacteriana podem conduzir à sobrestimação da actividade mutagénica.

O ensaio de mutação reversa bacteriana pode não ser apropriado para a avaliação de certas classes de produtos químicos, nomeadamente compostos altamente bactericidas (p.ex.: certos antibióticos) e produtos que se pensa (ou que se sabe) que interferem especificamente com o sistema de replicação das células de mamíferos (p.ex.: alguns inibidores da topoisomerase e alguns compostos análogos a nucleosídeos). Nesses casos, poderá ser mais apropriado utilizar ensaios de mutação em células de mamíferos.

Embora muitos dos compostos que dão resultados positivos no presente ensaio sejam carcinogénicos para os mamíferos, essa correlação não é absoluta. Com efeito, a correlação depende da classe química e, por outro lado, alguns agentes carcinogénicos não são detectados no ensaio pelo facto de o seu mecanismo ou mecanismos de actuação, não-genotóxicos, não afectar(em) as células bacterianas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As suspensões bacterianas são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólico exógeno. No método de incorporação em placas, as suspensões são misturadas num revestimento de gelose e depois vertidas na superfície duma lâmina de gelose com meio mínimo. No método com incubação prévia, a mistura de tratamento é incubada e só depois misturada com uma cobertura de gelose e preparada em placas com meio mínimo. Independentemente da técnica que tenha sido utilizada, as colónias com mutação reversa são contadas e comparadas com o número de colónias com mutação reversa espontânea em placas de controlo com solvente, após dois ou três dias de incubação.

Estão descritos diversos procedimentos para executar o ensaio de mutação reversa bacteriana. Entre os mais geralmente utilizados estão o método de incorporação em placas (1) (2) (3) (4), o método com incubação prévia (2) (3) (5) (6) (7) (8), o método em flutuação (9) (10) e o método em suspensão (11). As adaptações necessárias para os ensaios de gases ou vapores também se encontram descritas (12).

Os procedimentos descritos no presente método dizem principalmente respeito aos métodos de incorporação em placas e com incubação prévia. Qualquer dos dois é aceitável para a realização de experiências na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica. Algumas substâncias poderão ser detectadas de forma mais eficaz utilizando o método com incubação prévia. Essas substâncias pertencem a classes químicas que incluem as nitrosaminas alifáticas de cadeia curta, os metais, os aldeídos, os corantes azóicos e compostos diazóicos, os alcalóides de pirolizidina, os compostos alílicos e os compostos nitro (3). Por outro lado, certas classes de mutagêneos nem sempre são detectadas quando se utilizam os procedimentos padrão, tais como o método de incorporação em placas ou o método com incubação prévia. Esses casos são considerados “especiais” e recomenda-se fortemente que sejam utilizados procedimentos alternativos para a sua detecção. Estão já identificados os seguintes casos “especiais” (e exemplos dos procedimentos que podem ser utilizados para a sua detecção): corantes azóicos e compostos diazóicos (3) (5) (6) (13) gases e compostos químicos (12) (14) (15) (16) e glicósidos (17) (18) voláteis. Qualquer desvio do procedimento padrão terá de ser cientificamente justificado.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Preparação**

1.5.1.1. Bactérias

Devem ser utilizadas culturas frescas de bactérias na fase final do crescimento exponencial ou no início da fase estacionária (aproximadamente 10⁹ células/ml). Não devem ser utilizadas culturas em fase estacionária adiantada. É essencial que as culturas utilizadas na experiência contenham um título elevado de células viáveis, que pode ser demonstrado por dados históricos de controlo sobre as curvas de crescimento ou durante o próprio ensaio, através da determinação das células viáveis em placas.

A temperatura de incubação recomendada é 37°C.

Devem ser utilizadas pelo menos cinco estirpes das bactérias, entre as quais quatro estirpes de *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 ou TA97 ou TA97a; TA98; e TA100) para as quais foi demonstrado que são fiáveis e dão resultados reprodutíveis entre laboratórios. Essas quatro estirpes de *S. typhimurium* têm um par com as bases GC no local da inversão primária e sabe-se que não permitem detectar certos agentes mutagêneos oxidantes, de ligação cruzada nem hidrazinas. Essas substâncias podem ser detectadas utilizando as estirpes *E. coli* WP2 ou *S. typhimurium* TA102 (19) que têm um par com as bases AT no local da inversão primária. Por conseguinte, a combinação de estirpes recomendada é:

- *S. typhimurium* TA1535, e
- *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a, e
- *S. typhimurium* TA98, e
- *S. typhimurium* TA100, e
- *E. coli* WP2 uvrA, ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), ou *S. typhimurium* TA102.

Para a detecção de agentes mutagêneos causadores de ligações cruzadas, poderá ser preferível incluir a estirpe TA102 ou acrescentar uma estirpe capaz de reparar o ADN de *E. coli* [p.ex.: *E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101)]

Devem ser utilizados os procedimentos estabelecidos para a preparação de culturas de arranque, verificação dos marcadores e armazenamento. As quantidades de aminoácidos necessários para o crescimento (histidina para as estirpes de *S. typhimurium* e triptofano para as estirpes de *E. coli*) devem ser demonstradas para cada preparação de cultura de arranque conservada. Outras características fenotípicas devem também ser verificadas, a saber: a presença ou ausência de plasmídeos de Factor-r, quando necessário [ou seja, resistência à ampicilina nas estirpes TA98, TA100 e TA97 ou TA97a, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101) e resistência à ampicilina e à tetraciclina na estirpe TA102]; presença de mutações características (ou seja, mutação rfa em *S. typhimurium*, através da sensibilização com violeta de cristal, e mutação uvrA em *E. coli* ou mutação uvrB em *S. typhimurium*, através da sensibilização com raios ultravioleta) (2) (3). As estirpes devem ainda apresentar, de forma espontânea, contagens de mutações reversas nas gamas de frequência esperadas em função dos dados históricos de controlo do laboratório e também, de preferência, da literatura.

1.5.1.2. Meio

Será utilizado um meio mínimo de gelose apropriado (p.ex.: contendo meio mínimo Vogel-Bonner E e glucose) e uma cobertura de gelose com histidina e biotina ou triptofano para permitir alguma divisão celular (1) (2) (9).

1.5.1.3. Activação metabólica

As bactérias devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais geralmente utilizado é uma fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (1) (2) ou uma mistura de fenobarbitona e β -naftoflavona (18) (20) (21). A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama de 5 a 30% v/v na mistura S9. A escolha e o estado do sistema de activação metabólico podem depender da classe dos produtos químicos em estudo. Em alguns casos pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações diferentes de fracção pós-mitocondrial. Para os corantes azóicos para os compostos diazóicos, poderá ser mais indicado um sistema activação metabólica redutor (6) (13).

1.5.1.4. Substância em estudo / Preparação

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes da exposição das bactérias. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros.

1.5.2. Condições do ensaio

1.5.2.1. Estirpes (ver 1.5.1.1)

1.5.2.2. Concentração de exposição

A citotoxicidade e a solubilidade na mistura final constituem alguns dos critérios a ter em conta na da maior quantidade da substância em estudo a utilizar.

Poderá ser útil determinar a toxicidade e insolubilidade através de uma experiência preliminar. A citotoxicidade pode ser detectada pela redução do número de colónias com mutação reversa, pela presença de colónias mais claras ou de menores dimensões ou pelo grau de sobrevivência das culturas expostas. A citotoxicidade de uma substância pode variar na presença de sistemas de activação metabólicos. A insolubilidade deve ser avaliada em função da precipitação verificável a olho nú na mistura final nas condições reais do ensaio.

A concentração máxima de ensaio recomendada para substâncias solúveis não-citotóxicas é de 5 mg/placa ou de 5 µl/placa. Para as substâncias não-citotóxicas insolúveis a 5 mg/placa ou a 5 µl/placa, uma ou mais das concentrações ensaiadas devem ser insolúveis na mistura final. As substâncias de ensaio citotóxicas abaixo dos 5 mg/placa ou 5 µl/placa devem ser ensaiadas até uma concentração citotóxica. O precipitado não deve interferir com a contagem.

Numa experiência inicial, devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações analisáveis diferentes da substância em estudo, com intervalos aproximadamente semi-logarítmicos (ou seja, $\sqrt{10}$) entre as concentrações. Para a investigação da relação concentração-resposta poderão ser indicados intervalos menores. Poderá ser contemplada a possibilidade de ensaiar concentrações superiores a 5 mg/placa ou 5 µl/placa, quando se pretender avaliar substâncias que contenham quantidades substanciais de impurezas potencialmente mutagénicas.

1.5.2.3. Controlos negativos e positivos

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente ou veículo) específicos para cada estirpe, devendo, para os controlos positivos, ser escolhidas concentrações que demonstrem o desempenho eficaz de cada ensaio.

Para os ensaios com utilização de um sistema de activação metabólica, a substância de referência para os controlos positivos deve ser seleccionada com base no tipo de estirpe de bactéria utilizada.

As seguintes substâncias são exemplos de controlos positivos apropriados para os ensaios com activação metabólica:

Nº CAS	Nº EINECS	Nome
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantraceno
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenzo[<i>a</i>]antraceno
50-32-8	200-028-5	benzo[<i>a</i>]pireno
613-13-8	210-330-9	2-aminoantraceno
50-18-0	200-015-4	ciclofosfamida
6055-19-2		ciclofosfamida monohidrato

A seguinte substância é um controlo positivo apropriado para o método de activação metabólica reductor:

573-58-0	209-358-4	Vermelho do Congo
----------	-----------	-------------------

O 2-aminoantraceno não deve ser utilizado como único indicador da eficácia da mistura S9. Se essa substância for utilizada, cada lote S9 deve ser igualmente caracterizado com um agente mutagénico que exija activação metabólica por enzimas microsómicos, como por exemplo o benzo[a]pireno ou o dimetilbenzo[a]antraceno.

As seguintes substâncias são exemplos de controlos positivos específicos a cada estirpe apropriados para os ensaios sem utilização de um sistema exógeno de activação metabólica:

Nº CAS	Nº EINECS	Nome	Estirpe
26628-22-8	247-852-1	nitrito de sódio	TA 1535 e TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoreno	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoacridina	TA 1537, TA 97 e TA 97A
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 e TA 97A
80-15-9	201-254-7	hidroperóxido de isopropilbenzeno	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicina C	WP2 uvrA e TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	WP2, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitroquinolina-1-óxido	WP2, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101)
3688-53-7		furilfuramida (AF2)	estirpes com plasmídeos

Podem utilizar-se no controlo positivo outras substâncias adequadas. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe afim para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam.

Devem também realizar-se controlos negativos, consistindo apenas em solvente ou veículo e sem a substância em estudo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados históricos de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

1.5.3. **Procedimento**

Para o método de incorporação em placas (1) (2) (3) (4) sem activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,05 ml ou 0,1 ml da solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana fresca (aproximadamente 108 células viáveis) e 0,5 ml de tampão estéril, que são misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Para o ensaio com activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,5 ml de mistura de activação metabólica, que contém uma quantidade adequada de fracção pós-mitocondrial (entre 5 a 30% v/v na mistura de activação metabólica), misturada com a gelose de cobertura (2,0 ml), as bactérias e a substância em estudo/solução de ensaio. O conteúdo de cada tubo é misturado e deitado sobre uma placa de meio mínimo de gelose. A gelose de cobertura deve solidificar antes da incubação.

No método com incubação prévia (2) (3) (5) (6), a substância em estudo/solução de ensaio é previamente incubada com a estirpe de ensaio (aproximadamente 108 células viáveis) e o tampão estéril ou o sistema de activação metabólica (0,5 ml), geralmente durante 20 minutos ou mais a 30-37 °C, antes de ser misturada com a gelose de cobertura e deitada sobre uma placa com meio mínimo de gelose. Normalmente, são utilizados 0,05 ou 0,1 ml da substância em estudo/solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana e 0,5 ml da mistura S9 ou de tampão estéril, misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Os tubos devem ser arejados durante a pré-incubação, utilizando o agitador.

Para uma avaliação adequada da variação, devem ser utilizadas placas em triplicado para cada dose. A utilização de placas em duplicado é aceitável, desde que seja justificada cientificamente. A perda ocasional de uma placa não invalida necessariamente o ensaio.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Incubação**

Todas as placas de cada ensaio devem ser incubadas a 37°C durante 48-72 horas. Após a incubação, contam-se as colónias com mutação reversa em cada placa.

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados devem ser apresentados sob a forma do número de colónias com mutação reversa por placa. O número de colónias com mutação reversa nas placas de controlo negativas (controlo do solvente e, se tiver sido utilizado, controlo não exposto) e positivas deve também ser apresentado. As contagens individuais das placas, o número médio de colónias com mutação reversa por placa e o respectivo desvio-padrão devem ser apresentados para a substância em estudo e para os controlos positivos e negativos (não expostos à substância em estudo e/ou solvente).

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara. Os resultados ambíguos devem ser melhor esclarecidos, de preferência com modificação das condições experimentais. Os resultados negativos têm de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação. Para a realização de experiências adicionais, deve ser analisada a possibilidade de modificação dos parâmetros do estudo, por forma a aumentar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros que podem eventualmente ser alterados incluem a gama de concentrações, o método de tratamento (incorporação em placas ou pré-incubação em meio líquido) e as condições de activação metabólica.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento do número de colónias por placa com mutação reversa em pelo menos uma estirpe, com ou sem sistema de activação metabólico, que esteja relacionado com a concentração na gama ensaiada e/ou que seja reprodutível numa ou mais das concentrações ensaiadas (23). Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (24). Contudo, a significância estatística não deve ser o único elemento de determinação para uma resposta positiva.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não-mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio de mutação reversa bacteriana indica que a substância induz mutações pontuais por substituição das bases ou por deslocação do quadro de leitura no genoma de *Salmonelas typhimurium* e/ou *Escherichia coli*. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância não é mutagénica para as espécies ensaiadas.

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/Veículo

- justificação para a escolha do solvente/veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Estirpes:

- estirpes usadas;
- número de células por cultura;
- características da estirpe.

Condições de ensaio:

- quantidade da substância em estudo por placa (mg/placa ou µl/placa), com justificação da escolha da dose e do número de placas preparadas por concentração;
- meios utilizados;
- tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade;
- protocolo do tratamento.

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- sinais de precipitação;
- contagens individuais das placas;
- número médio de colónias com mutação reversa por placa e respectivo desvio-padrão;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos aos controlos negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão;
- dados históricos relativos aos controlos negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

BIBLIOGRAFIA

1. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
2. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233.
4. Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, 69-240.
5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, 91-96.
6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.
7. Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
8. Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, 167-177.
9. Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, 33-42.
10. Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
11. Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, 453-465.
12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Res.*, 307, 335-344.
13. Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. *Mutation Res.*, 136, 33-47.
14. Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, 2-141.
15. Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
16. Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, 421-441.

17. Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, 39, 3780-3782.
18. Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4961-4965.
19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Ensaio strains. *Mutagenesis*, 5, 285-291.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: "In Vitro metabolic Activation in Mutagenesis Testing" Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
21. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. *Mutation Res.*, 88 343-350.
23. Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. *Mutation Res.* 189, 83-91.
24. Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

B. 15

MUTAÇÃO GÊNICA — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Podem utilizar-se várias estirpes haplóides e diplóides do fungo *Saccharomyces Cerevisiae* para medir a produção de mutações gênicas induzidas por agentes químicos em presença e na ausência de activação metabólica.

A medição de mutações *forward* (*forward mutations*) pode ser realizada nomeadamente pela medição da passagem dos mutantes vermelhos que exigem adenina (*ade-1*, *ade-2*) para uma forma branca duplamente exigente em adenina, assim como por sistemas selectivos como a indução de resistência à canavanina e à cicloheximida.

O método de mutação reversível mais frequentemente utilizado implica a utilização da estirpe haplóide XV 185-14C que inclui as mutações *nonsense* ocre *ade 2 - 1*, *arg 4 - 17*, *lys 1-1* e *trp 5-48*, que são reversíveis por mutagénios que provoquem substituições de bases induzindo mutações num *locus* específico ou mutações supressivas ocre. A estirpe XV 185-14C inclui igualmente o marcador *his 1-7*, uma mutação *nonsense*, principalmente reversível pelas mutações de segundo *locus* e ainda o marcador *hom 3-10* que é reversível por mutagénios conduzindo à ultrapassagem do quadro de leitura do código genético (*Frameshift Mutation*).

Das estirpes diplóides de *S. Cerevisiae* a única cujo uso está generalizado é a estirpe D₇ que é homozigótica para *ilv 1-92*.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

As soluções das substâncias a testar bem como as das substâncias de controlo serão preparadas imediatamente antes do ensaio, com a ajuda dum veículo apropriado. Quando se tratar de substâncias orgânicas não solúveis na água, deverão ser utilizados os solventes orgânicos como o etanol, a acetona ou o dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração não ultrapassando 2% v/v. A concentração final do veículo não deve afectar de forma significativa a viabilidade das células nem as características de crescimento.

Activação metabólica

As células deverão ser expostas às substâncias a testar na presença e na ausência dum sistema exógeno de activação metabólica apropriado.

O método mais frequentemente utilizado consiste na adição da fracção pós-mitocondrial preparada a partir de fígados de roedores tratados previamente por indutores enzimáticos e adicionada de cofactores. Podem utilizar-se também outras espécies, tecidos, fracções pós-mitocondriais ou métodos para a activação metabólica.

Condições do ensaio

Estirpes de experiência

A estirpe haplóide XV 185-14 C e a estirpe diplóide D₇ são as mais frequentemente utilizadas em estudos de mutação génica. Podem também ser apropriadas outras estirpes.

Meios

Utilizam-se meios de cultura apropriados para determinar a sobrevivência celular e o número de mutantes.

Uso de controlos negativos e positivos

Deverão ser realizados simultaneamente controlos positivos, controlos não tratados e controlos com solvente. Serão utilizadas substâncias químicas apropriadas como controlos positivos para cada fenómeno mutacional específico.

Concentrações de exposição

Deverão ser utilizados pelo menos cinco concentrações convenientemente espaçadas da substância a testar. No caso de substâncias tóxicas a concentração máxima testada não deverá diminuir a taxa de sobrevivência abaixo de 5 a 10%. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade com métodos apropriados. No caso das substâncias não tóxicas francamente solúveis na água a concentração máxima será determinada caso a caso.

Condições de incubação

Devem incubar-se as placas no escuro à temperatura de 28 a 30 °C durante quatro a sete dias.

Frequências de mutações espontâneas

Serão utilizadas as subculturas cujas frequências de mutação espontânea estejam situadas dentro dos limites normais admitidos.

Número de placas

Deverão utilizar-se pelo menos 3 placas por concentração para determinar os prototróficos produzidos por mutação génica e observar a viabilidade das células. No caso de experiências usando marcadores com uma pequena taxa de mutação como o *hcm* 3-10, pode aumentar-se o número de placas utilizado para fornecer dados estatisticamente significativos.

Procedimento

As estirpes de *S. cerevisiae* são tratadas habitualmente no curso dum ensaio em meio líquido, implicando a utilização de células em fase estacionária ou de crescimento. As experiências iniciais deveriam ser efectuadas com células em crescimento. Expõem-se à substância a testar $1-5 \times 10^7$ células/ml durante um período até 18 horas, à temperatura de 28 a 37 °C, agitando-se a mistura; deve adicionar-se uma quantidade adequada dum sistema de activação metabólica durante o tratamento. No fim do tratamento as células serão centrifugadas, lavadas, e semeadas num meio de cultura apropriado. Depois da incubação as placas serão examinadas para se determinar a taxa de sobrevivência e a indução de mutações génicas.

Se a primeira experiência der resultados negativos deve realizar-se segunda, utilizando-se células em fase estacionária. Se a primeira experiência der resultados positivos, estes serão confirmados por uma experiência independente apropriada.

2.

RESULTADOS

Os resultados devem ser apresentados em quadros, indicando o número de colónias contadas, o número de mutantes, a taxa de sobrevivência e a frequência de mutantes. Todos os resultados deverão ser confirmados por uma experiência independente. Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos adequados.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

- estirpe utilizada,
- condições do teste: células em fase estacionária ou de crescimento, composição dos meios, temperatura e duração da incubação, sistema de activação metabólica,
- condições do tratamento: níveis de exposição, procedimento e duração do tratamento, temperatura do tratamento, controlos positivos e negativos,
- número de colónias contadas, número de mutantes, taxa de sobrevivência e frequência de mutantes, relação dose/resposta se possível, avaliação estatística dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 16
RECOMBINAÇÃO MITÓTICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. **MÉTODO**

1.1. **Introdução**

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. **Definição**

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. **Substâncias de referência**

Nenhuma.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

A recombinação mitótica no *Saccharomyces Cerevisiae* pode ser detectada ao nível intergénico (ou mais generalizadamente entre um gene e o seu centrómero) e ao nível intragénico. O primeiro caso denomina-se *crossing-over* mitótico e dá origem a trocas recíprocas, enquanto no segundo caso as trocas são não-recíprocas a maior parte das vezes, sendo este denominado conversão génica. O *crossing-over* é geralmente detectado pela produção de colónias ou de sectores recessivos homozigóticos a partir de uma estirpe heterozigótica, enquanto a conversão génica é detectada pela produção de prototróficos revertidos duma estirpe auxotrófica heteroalélica contendo dois alelos defeituosos diferentes do mesmo gene. As estirpes mais correntemente utilizadas para detectar uma conversão génica mitótica são as D₄ (heteroalélica para *ade 2* e *trp 5*), D₇ (heteroalélica para *trp 5*), BZ₃₄ (heteroalélica para *arg 4*) e JDI (heteroalélica para *his 4* e *trp 5*). O *crossing-over* mitótico produzindo sectores homozigóticos de cor vermelha e rosa pode ser determinado com D₅ ou D₇ (que mede também a conversão génica mitótica e a mutação reversível para *ilv 1—92*), sendo estas duas estirpes heteroalélicas complementares para os alelos *ade 2*.

1.5. **Critérios qualitativos**

Nenhum.

1.6. **Descrição do método do ensaio**

Preparativos

As soluções das substâncias a testar assim como das substâncias de controlo ou de referência deverão ser preparadas imediatamente antes do ensaio, com a ajuda do veículo apropriado. No caso de substâncias orgânicas insolúveis na água deverão utilizar-se solventes orgânicos como o etanol, a acetona e o dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações não ultrapassando 2% v/v. A concentração final do veículo não deverá afectar de maneira significativa a viabilidade das células nem as características de crescimento.

Activação metabólica

As células serão expostas às substâncias a testar na presença e na ausência de um sistema exógeno de activação metabólica. O método mais frequentemente utilizado consiste na adição da fracção pós-mitocondrial preparada a partir de fígados de roedores tratados previamente com indutores enzimáticos e adicionada de cofactores. Podem também utilizar-se outras espécies, tecidos, fracções pós-mitocondriais ou métodos para activação metabólica.

Condições do ensaio

Estirpes de experiência

As estirpes mais frequentemente utilizadas são as diplóides D₄, D₅, D₇ e JDI. Podem também ser apropriadas outras estirpes.

Meios

Utilizam-se os meios de cultura apropriados para determinar a taxa de sobrevivência e a frequência de recombinações mitóticas.

Uso de controlos negativos e positivos

Deverão ser realizados simultaneamente controlos positivos, controlos não tratados e controlos com solvente. Serão utilizadas substâncias químicas apropriadas como controlos positivos para cada tipo específico de recombinação.

Concentrações de exposição

Deverão ser utilizadas pelo menos cinco concentrações convenientemente espaçadas da substância a testar. A citotoxicidade e a solubilidade são alguns dos factores a ter em consideração. A concentração mais fraca não deve ter qualquer efeito na viabilidade das células. No caso de produtos químicos tóxicos, a concentração máxima testada não deve diminuir a taxa de sobrevivência abaixo de 5 a 10%. Os produtos químicos relativamente insolúveis na água serão testados até ao seu limite de solubilidade por métodos apropriados. No caso de produtos químicos não tóxicos, francamente solúveis na água, a concentração máxima testada será determinada caso a caso.

As células podem ser expostas às substâncias a testar em fase estacionária ou em fase de crescimento durante períodos de duração até 18 horas. No entanto, no caso de um tratamento de longa duração, as culturas serão examinadas ao microscópio para se detectar a formação de esporos, cuja presença tornará o teste nulo.

Condições de incubação

As placas serão incubadas no escuro a uma temperatura de 28 a 30 °C, durante quatro a sete dias. As placas utilizadas para a determinação dos sectores homocigóticos vermelho e rosa produzidos por *crossing-over* mitótico serão conservadas num refrigerador a ± 4 °C durante mais um a dois dias antes da contagem, de modo a que a pigmentação das colónias interessadas possa intensificar-se.

Frequência de recombinações mitóticas espontâneas

Deverão utilizar-se subculturas cujas frequências de recombinação mitótica se situarem dentro da gama admitida normalmente.

Número de placas

Deverão ser semeadas pelo menos três placas por concentração a fim de determinar a viabilidade bem como o número de prototróficos produzidos por conversão génica mitótica.

No caso de determinação da homocigotia recessiva produzida por *crossing-over* mitótico, o número de placas será aumentado para se obter um número de colónias adequado.

Procedimento

As estirpes de *S. cerevisiae* são tratadas habitualmente no curso de um ensaio em meio líquido, implicando a utilização de células em fase estacionária ou de crescimento. As experiências iniciais deveriam ser efectuadas com células em crescimento. São expostas $1-5 \times 10^7$ células/ml à substância a testar durante um período até 18 horas, à temperatura de 28 a 37 °C, agitando-se a mistura; deve adicionar-se uma quantidade adequada de um sistema de activação metabólica durante o tratamento. No fim do tratamento as células serão centrifugadas, lavadas e semeadas no meio de cultura adequado. Depois da incubação, as placas serão examinadas a fim de determinar a taxa de sobrevivência e a indução de recombinação mitótica. Se a primeira experiência der resultados negativos deve realizar-se segunda, utilizando-se células em fase estacionária. Se a primeira experiência der resultados positivos, estes serão confirmados por uma experiência independente apropriada.

2.

RESULTADOS

Os resultados devem ser apresentados em quadros, indicando o número de colónias contadas, o número de recombinantes, a taxa de sobrevivência e a frequência de recombinantes.

Todos os resultados deverão ser confirmados por uma experiência independente.

Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos adequados.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as informações seguintes:

- estirpe utilizada,
- condições do teste: células em fase estacionária ou em fase de crescimento, composição dos meios, temperatura e duração da incubação, sistema de activação metabólica,
- condições de tratamento: concentração de exposição, procedimento e duração do tratamento, temperatura do tratamento, controlos positivos e negativos,
- número de colónias contadas, número de recombinantes, taxa de sobrevivência e frequência de recombinação, relação dose/reposta se possível; avaliação estatística dos resultados,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 17. MUTAGENICIDADE – ENSAIO DE MUTAÇÃO GÉNICA EM CÉLULAS DE

MAMÍFEROS *IN VITRO*

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 476 - Ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* pode ser utilizado para detectar mutações génicas induzidas por substâncias químicas. As linhas celulares que podem ser utilizadas incluem as células L5178Y do linfoma do rato, as linhas celulares CHO, CHO-AS52 e V79 do hamster chinês e as células linfoblastóides humanas TK6 (1). Nessas linhas celulares, os pontos finais genéticos mais utilizados são as mutações da timidina quinase (TK), da hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) e do transgene de xantina-guanina fosforibosil transferase (XPRT). Os ensaios de mutação TK, HPRT e XPRT detectam diferentes gamas de ocorrências genéticas. A localização autossómica das mutações TK e XPRT pode permitir a detecção de ocorrências genéticas (p.ex.: supressão de grandes sequências) que não são detectadas no *locus* da HPRT nos cromossomas X (2) (3) (4) (5) (6).

No ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro*, podem ser utilizadas culturas de qualquer linha celular ou estirpe de características bem conhecidas. As células utilizadas são seleccionadas com base na sua capacidade de desenvolvimento em cultura e na estabilidade da frequência das mutações espontâneas.

Os ensaios realizados *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica. Os sistemas de activação metabólicos *in vitro* não reproduzem inteiramente as condições *in-vivo* nos mamíferos. Devem portanto ser evitadas condições que conduzam a resultados que não reflectem uma mutagenicidade intrínseca. Os eventuais resultados positivos não resultantes de mutagenicidade intrínseca podem ser causados por alterações do pH, da pressão osmótica ou por níveis elevados de citotoxicidade (7).

O presente ensaio é utilizado para o controlo de eventuais agentes mutagénicos e carcinogénicos em mamíferos. Embora muitos dos compostos que dão resultados positivos no presente ensaio sejam carcinogénicos para os mamíferos, essa correlação não é absoluta. Com efeito, a correlação depende da classe química e, por outro lado, há cada vez mais dados que provam que alguns agentes carcinogénicos não são detectados no ensaio porque parecem actuar através de mecanismos não genotóxicos ou ausentes nas células bacterianas (6).

Ver também a Parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

Mutagénicos por substituição de um par de bases: substâncias que causam a substituição de um ou vários pares de bases do ADN.

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

Período de expressão fenotípica: período que decorre até que os produtos dos genes inalterados se esgotem nas células recentemente sujeitas a uma mutação.

Frequência de mutação: relação entre o número de células mutantes observadas e o número de células viáveis.

Crescimento total relativo: aumento no número de células por unidade de tempo, por comparação com uma população de controlo; calculado como o produto da relação entre o crescimento em suspensão e no controlo negativo com a relação entre a eficiência de clonagem em suspensão e no controlo negativo.

Crescimento relativo em suspensão: relação entre o aumento no número de células durante o período de expressão em suspensão e no controlo negativo.

Viabilidade: eficiência de clonagem das células expostas incubadas em placas, após o período de expressão, sob condições selectivas.

Sobrevivência: eficiência de clonagem das células expostas incubadas em placas no fim do período de exposição; a sobrevivência é geralmente expressa em relação à sobrevivência da população celular de controlo.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As células deficientes em timidina quinase (TK) devido à mutação TK+/- → TK-/- são resistentes aos efeitos citotóxicos do análogo de pirimidina da trifluorotimidina (TFT). As células que dispõem de timidina quinase são sensíveis ao TFT, que causa inibição do metabolismo celular e impede a divisão da célula. Logo, as células mutantes podem proliferar na presença de TFT, o que não acontece com as células normais, com timidina quinase. Da mesma forma, as células carentes em HPRT ou XPRT são seleccionadas pela resistência à 6-tioguanina (TG) ou à 8-azaguanina (AG). As propriedades da substância em estudo devem ser cuidadosamente tomadas em consideração se o ensaio de mutação génica em células de mamíferos for utilizado para ensaiar uma substância análoga das bases ou um composto relacionado com o agente selectivo. Assim, por exemplo, deve ser investigada qualquer suspeita de toxicidade selectiva da substância em estudo para as células mutantes e não mutantes. Logo, o desempenho do sistema/agente selectivo deve ser confirmado quando se ensaiarem produtos químicos estruturalmente relacionados com o agente selectivo (8).

As células em suspensão ou em cultura em monocamada são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica durante um período de tempo apropriado, sendo depois cultivadas para determinar a citotoxicidade e para permitir a expressão fenotípica antes de se seleccionar o mutante (9) (10) (11) (12) (13). A citotoxicidade é geralmente determinada através da medição da eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou do crescimento total relativo das culturas após o período de exposição. As culturas expostas são mantidas em meio de crescimento durante um período de tempo suficiente, que varia em função do *locus* seleccionado e do tipo de célula, por forma a permitir uma expressão fenotípica tão boa quanto possível das mutações induzidas. A frequência de mutação é determinada inoculando um número conhecido de células num meio com agente selectivo para as células mutantes e num meio sem agente selectivo, para determinação das respectivas eficiências de clonagem (viabilidade). Após um período de incubação apropriado, as colónias são contadas. A frequência de mutação é calculada a partir do número de colónias mutantes no meio selectivo e do número de colónias no meio não selectivo.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Células*

O presente ensaio pode ser realizado com diversos tipos de células, nomeadamente subclones das células L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 ou TK6. Os tipos de célula utilizados no presente ensaio devem ter uma sensibilidade demonstrada a mutagêneos químicos, uma eficiência de clonagem elevada e uma frequência de mutação espontânea estável. As células devem ser verificadas para detectar eventuais contaminações por micoplasma, não devendo ser utilizadas se estiverem contaminadas.

O ensaio deve ser concebido para ter uma determinada sensibilidade e definição. O número de células e de culturas e as concentrações da substância em estudo a utilizar serão reflexo dos parâmetros definidos (14). O número mínimo de células viáveis que devem sobreviver à exposição e ser utilizadas em cada fase do ensaio deve basear-se na frequência de mutação espontânea. A título indicativo, deve ser utilizado um número de células pelo menos dez vezes superior ao inverso da frequência de mutação espontânea, com um mínimo recomendado de 106 células. Para verificação da consistência do desempenho do ensaio, devem estar disponíveis dados históricos adequados sobre o sistema celular utilizado.

1.4.1.2. *Meios e condições de cultura*

Devem ser utilizados meios de cultura e condições de incubação (recipientes, temperatura, CO₂, concentração e humidade) apropriados. Os meios devem ser escolhidos de acordo com o sistema selectivo e com o tipo de células utilizados no ensaio. É particularmente importante que sejam escolhidas condições de cultura que garantam o crescimento óptimo das células durante o período de expressão e a capacidade de formação de colónia por parte das células mutantes e não mutantes.

1.4.1.3. *Preparação das culturas*

As células são propagadas a partir de culturas de arranque, inoculadas no meio de cultura e incubadas a 37°C. Antes da realização no presente ensaio, as culturas poderão ter de ser limpas de células mutantes eventualmente presentes.

1.4.1.4. *Activação metabólica*

As bactérias devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais geralmente utilizado é uma fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) ou uma mistura de fenobarbitona e β-naftoflavona (19) (20).

A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama de 1-10% v/v no meio de ensaio final. A escolha e estado do sistema de activação metabólico podem depender da classe de produto químico em estudo. Em alguns casos, poderá ser apropriado utilizar mais de uma concentração da fracção pós-mitocondrial.

Alguns desenvolvimentos, nomeadamente a produção por engenharia genética de linhas celulares que expressem enzimas de activação específicos, podem ter algum potencial em termos de activação endógena. A escolha das linhas celulares utilizadas deve ser cientificamente justificada (p.ex.:pela importância da isoenzima do citocromo P450 para o metabolismo da substância em estudo).

1.4.1.5. *Substância em estudo/Preparação*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes da exposição das células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros. A água poderá ser removida através de um filtro molecular.

1.4.2.2. *Concentrações de exposição*

A citotoxicidade, a solubilidade no sistema de ensaio e as alterações do pH ou da pressão osmótica constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação da concentração máxima.

A citotoxicidade deve ser determinada tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica na experiência principal, utilizando um indicador apropriado da integridade e crescimento das células, tal como a eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou o crescimento relativo total. Poderá ser útil determinar a toxicidade e insolubilidade através de uma experiência preliminar.

Devem ser utilizadas pelo menos quatro concentrações analisáveis. Quando existir citotoxicidade, essas concentrações devem abranger uma gama de toxicidade que varie da toxicidade máxima a quase nula; o que significa geralmente que as concentrações devem variar num factor de 2 a $\sqrt{10}$. Se a concentração máxima for definida por razões de citotoxicidade, a sobrevivência relativa (eficiência relativa de clonagem) ou o crescimento relativo total devem ser da ordem dos 10-20% (mas não inferiores a 10%). Para as substâncias com citotoxicidade relativamente baixa, a concentração máxima do ensaio deve ser a mais baixa de 5 μ l/ml, 5 mg/ml ou 0,01 M.

Para substâncias relativamente insolúveis a dose máxima a utilizar deve ser igual ou superior ao limite de solubilidade nas condições de cultura. A insolubilidade no meio final a que as células são expostas deve ser demonstrada. Poderá ser útil avaliar a solubilidade no início e no fim do tratamento, uma vez que a mesma se pode alterar durante a exposição no sistema de ensaio devido à presença de células, de S9, de soro, etc. A insolubilidade pode ser detectada à vista desarmada. O precipitado não deve interferir com as contagens necessárias.

1.4.2.3. *Controlos negativos e positivos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo), tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Quando for utilizada activação metabólica, o produto químico de controlo positivo deve ser o mesmo que exige activação para dar uma resposta mutagénica.

As substâncias de controlo positivo podem ser, por exemplo:

Condição de activação metabólica	Locus	Substância	Nº CAS.	Nº EINECS
Ausência de activação metabólica exógena	HPRT	Metanosulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
	TK (colónias pequenas e grandes)	Metanosulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Metanosulfonato etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
	Presença de Activação Metabólica Exógena	HPRT	3-3-Metilcolantreno	56-49-5
N- Nitrosodimetilamina			62-75-9	200-549-8
7,12-Dimetilbenzantraceno			57-97-6	200-359-5
TK (colónias pequenas e grandes)		Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
		Ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
		3-3-Metilcolantreno	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-n-Nitrosodimetilamina (níveis elevados de S-9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5

Podem ser utilizadas outras substâncias de referência apropriadas para o controlo positivo. Assim, se um laboratório dispuser, por exemplo, de uma base de dados históricos sobre a utilização de 5-bromo 2'-deoxiuridina [nº CAS 59-14-3, nº EINECS 200-415-9], essa substância de referência poderá também ser utilizada. Quando existam, deve ser analisada a possibilidade de utilizar produtos químicos de controlo positivos de classes químicas relacionadas.

Devem também realizar-se controlos negativos, consistindo apenas em solvente ou veículo e sem a substância em estudo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados históricos de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

1.4.3. **Procedimento**

1.4.3.1. *Exposição à substância em estudo*

As células em proliferação devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica durante um período de tempo apropriado (três a seis horas é geralmente eficaz). O período de exposição pode ser alargado a um ou mais ciclos celulares.

Para cada concentração a ensaiar, podem ser utilizadas culturas expostas únicas ou em duplicado. Quando forem utilizadas culturas únicas, o número de concentrações deve ser aumentado, por forma a garantir um número de culturas adequado para a análise (p.ex.: pelo menos 8 concentrações analisáveis). Devem também ser incluídas culturas de controlo negativas (solventes) duplicadas.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (21) (22).

1.4.3.2. *Medição da sobrevivência, viabilidade e frequência de mutação*

No fim do período de exposição, as células são lavadas e cultivadas para determinar a sobrevivência e para permitir a expressão fenotípica das mutações. A medição de citotoxicidade através da determinação da eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou do crescimento total relativo das culturas é geralmente iniciada após o período de exposição.

Para cada *locus*, há um tempo mínimo definido para permitir uma expressão fenotípica quase óptima das mutações recentemente induzidas (o HPRT e o XPRT exigem pelo menos 6-8 dias e o TK pelo menos 2 dias). As células são cultivadas em meios com presença e ausência do agente selectivo para determinação, respectivamente, do número de mutações e da eficiência de clonagem. A medição da viabilidade (utilizada para calcular a frequência de mutação) é iniciada no fim do período de expressão através de cultura em placas com meio não selectivo.

Se a substância em estudo der um resultado positivo no ensaio L5178Y TK+/-, deve ser realizada uma medição do tamanho das colónias em pelo menos uma das culturas de ensaio (a concentração máxima com resultado positivo) e nos controlos negativos e positivos. Se a substância em estudo der um resultado negativo no ensaio L5178Y TK+/-, deve ser realizada uma medição do tamanho das colónias nos controlos negativos e positivos. Nos estudos que utilizem TK6TK+/-, a medição do tamanho das colónias poderá também ser realizada.

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados devem incluir a determinação da citotoxicidade e da viabilidade, para além da contagem das colónias e das frequências de mutação nas culturas expostas e nas culturas de controlo. No caso de um resultado positivo no ensaio L5178Y TK+/-, as colónias devem ser contabilizadas utilizando o critério das colónias pequenas e grandes em pelo menos uma das concentrações da substância em estudo (a concentração máxima com resultado positivo) e nos controlos negativos e positivos. A natureza molecular e citogénica das células mutantes que formam colónias grandes e pequenas já foi investigada em pormenor (23) (24). No ensaio TK+/-, as colónias devem ser contabilizadas utilizando os critérios do crescimento normal (colónias grandes) e do crescimento lento (colónias pequenas) (25). As células mutantes que tenham sofrido danos genéticos mais extensos apresentam tempos de duplicação maiores, pelo que formam colónias mais pequenas. Esses danos variam tipicamente da perda da totalidade dos genes a aberrações cromossómicas só visíveis por análise do cariótipo. A indução de mutações que resultam no aparecimento de colónias pequenas foi associada com produtos químicos que induzem aberrações cromossómicas graves (26). As células menos seriamente afectadas por mutações apresentam taxas de crescimento semelhantes às células parentais e formam colónias grandes.

Deve ser apresentada a sobrevivência (eficiência relativa de clonagem) ou o crescimento total relativo. A frequência de mutação deve ser expressa como a relação entre o número de células mutantes e o número de células sobreviventes.

Devem ser fornecidos dados individuais das culturas. Para além disso, todos os dados devem ser apresentados sob a forma de um quadro.

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara. Os resultados ambíguos devem ser melhor esclarecidos, de preferência com modificação das condições experimentais. Os resultados negativos têm de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação. Para a realização de experiências adicionais, deve ser analisada a possibilidade de modificação dos parâmetros do estudo, por forma a aumentar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros que podem eventualmente ser alterados incluem a gama de concentrações e as condições de activação metabólica.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento da frequência de mutação que esteja relacionado com a concentração na gama testada e/ou que seja reprodutível. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos. Contudo, a importância estatística não deve ser o único elemento de determinação para uma resposta positiva.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não-mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* indica que a substância induz mutações génicas nas culturas de células de mamíferos utilizadas. Uma resposta positiva à concentração que seja reprodutível é mais significativa. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância não induz mutações génicas nas culturas de células de mamífero utilizadas.

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

- justificação para a escolha do veículo
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida;

Células:

- tipo e origem das células;
- número de culturas celulares;
- número de transferências, quando aplicável;
- métodos de manutenção da cultura celular, quando aplicável;
- ausência de micoplasma.

Condições de ensaio:

- justificação para a selecção das concentrações e do número de culturas, incluindo, p.ex., dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade, quando disponíveis;
- composição dos meios, concentração de CO₂;
- concentração da substância em estudo;
- volumes adicionados do veículo e da substância em estudo;
- temperatura de incubação;
- tempo de incubação;
- duração do tratamento;
- densidade celular durante a exposição;
- tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade;
- controlos positivos e negativos;
- duração do período de expressão (incluindo o número de células inoculadas e os calendários de sub-cultura e de alimentação, quando aplicável);
- agente selectivo;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;
- métodos utilizados para a enumeração dos números de células mutantes e viáveis;
- definição das colónias cuja dimensão e tipo são caracterizados (incluindo os critérios para a definição de colónias “pequenas” e “grandes”, conforme apropriado.

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- sinais de precipitação;
- dados sobre o pH e a pressão osmótica durante a exposição à substância de ensaio, caso tenham sido determinados;
- dimensão das colónias, caso tenha sido medida pelo menos para os controlos positivos e negativos;
- capacidade do laboratório para a detecção de pequenas colónias mutantes no sistema L5178Y TK^{+/+}, quando aplicável;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos ao controlo negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio;
- dados históricos sobre o controlo negativo (solvente/veículo) e positivo, com as gamas, valores médios e desvios-padrão;
- frequência das mutações.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

BIBLIOGRAFIA

1. Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
2. Chu, E.H.Y. and Mallig, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
3. Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94, 467-485.
4. Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagenesis*, 4, 394-403.
5. Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121-128.
6. Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235-239.
7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 115, 225-251.
9. Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17-36.
10. Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
11. Liber, H.L., Yandell, D.W. and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
12. Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
13. Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK+/- - TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
14. Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365-373.

16. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
17. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, 61-108.
18. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
19. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
21. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
22. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
23. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 51-55.
24. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, 161-174.
25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. *Mutation Res.*, 229, 89-102.
26. Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, 609-614.

B. 18

LESÃO E REPARAÇÃO DO ADN — SÍNTESE NÃO PROGRAMADA — CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O Teste de Síntese Não-Programada de ADN (Unscheduled DNA Synthesis-UDS) mede a síntese de ADN para reparação após excisão e remoção de um fragmento de ADN contendo uma região de lesão induzida por agentes químicos e físicos. O teste baseia-se na incorporação da timidina marcada com trítio ($^3\text{H-TdR}$) no ADN de células de mamífero não se encontrando na fase S do ciclo celular. Pode determinar-se a incorporação de $^3\text{H-TdR}$ examinando o ADN proveniente das células tratadas por auto-radiografia ou por contagem de cintilação em meio líquido (LSC-Liquid Scintillation Counting).

As células de mamífero em cultura, com a excepção dos hepatócitos primários de rato, são tratadas com a substância a testar em presença e na ausência dum sistema exógeno de activação metabólica. A UDS pode também ser medida por métodos *in vivo*.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

As substâncias a testar, bem como as de controlo ou de referência serão preparadas no meio de cultura, dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados, sendo depois diluídas em meio de cultura, antes de utilizadas no ensaio. A concentração final não deverá afectar a viabilidade celular.

Podem ser utilizadas neste ensaio culturas primárias de hepatócitos de rato, linfócitos humanos ou linhas celulares estabelecidas (por exemplo: fibroblastos humanos diplóides).

As células serão expostas à substância a testar em presença e na ausência de um sistema de activação metabólica apropriado.

Condições experimentais

Número de culturas

São necessárias para cada ponto experimental, pelo menos duas culturas celulares para a auto-radiografia e seis culturas celulares (ou menos se tal se justificar tecnicamente) para a contagem de cintilação em meio líquido.

Uso de controlos negativos e positivos

Deverão ser incluídos em cada experiência controlos simultâneos (não tratados e/ou veículo) com e sem activação metabólica. Para o ensaio com hepatócitos de rato, por exemplo, pode utilizar-se como controlo positivo o 7,12

DMBA (7,12-dimetil benzantraceno) ou o 2-AAF (2-acetilaminofluoreno). No caso de linhas celulares estabelecidas, em ensaios com auto-radiografia ou LSC realizados sem activação metabólica, pode utilizar-se como controlo o 4-NQO (4-nitroquinolina N-óxido); quando se tiver recorrido a sistemas de activação metabólica, a N-dimetil-nitrosamina é um dos compostos utilizáveis como controlo positivo.

Concentrações de exposição

Deverá utilizar-se uma gama de concentrações da substância a testar, para permitir uma boa determinação da resposta. A concentração máxima deverá produzir alguns efeitos citotóxicos. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade. No que respeita às substâncias não tóxicas francamente solúveis na água, a concentração máxima a testar deverá ser determinada caso a caso.

Células

Para a manutenção das culturas recorrer-se-á a meios de cultura, a uma concentração de CO₂, a uma temperatura e humidade apropriados. As linhas celulares estabelecidas deverão ser examinadas periodicamente para detectar uma contaminação por *Mycoplasma*.

Activação metabólica

Não se utiliza nenhum sistema de activação metabólica nas culturas primárias de hepatócitos.

As linhas celulares estabelecidas e os linfócitos são expostos à substância a testar em presença e na ausência de um sistema de activação metabólica apropriado.

Procedimentos

Preparação das culturas

As linhas celulares estabelecidas provenientes de culturas «mãe» (por exemplo: por tripsinização ou por agitação) são semeadas em recipientes de cultura numa densidade adequada e incubada a 37 °C.

As culturas de pouca duração de hepatócitos de rato são estabelecidas permitindo que os hepatócitos recentemente dissociados num meio apropriado possam aderir à superfície de crescimento.

As culturas de linfócitos humanos são realizadas com técnicas apropriadas.

Tratamento das culturas com substância a testar

Hepatócitos primários de rato

Tratam-se hepatócitos primários de rato, isolados recentemente, com a substância a testar no meio contendo ³H-TdR, durante um período de tempo adequado. No fim do período de tratamento o meio será eliminado, as células lavadas, fixadas e secadas. As lâminas são mergulhadas numa emulsão de auto-radiografia [em alternativa pode usar-se uma película fotográfica (*stripping film*)] passando depois à exposição, revelação, coloração e contagem.

Linhas celulares estabelecidas e linfócitos

Técnicas auto-radiográficas: Expõem-se as culturas celulares à substância a testar durante períodos de tempo adequados, sendo tratadas em seguida com a ³H-TdR. A duração da exposição será função da natureza da substância, da actividade do sistema metabólico e do tipo das células. Para detectar o pico da UDS, deverá acrescentar-se a ³H-TdR, seja ao mesmo tempo que a substância a testar, seja nos minutos que se seguem à exposição à substância a testar. A escolha entre estas duas técnicas será determinada por eventuais interações entre a substância testada e a ³H-TdR. Para se poder fazer a distinção entre a UDS e a replicação semiconservativa do ADN pode inibir-se esta última utilizando-se, por exemplo, um meio deficiente em arginina, um baixo teor de sódio ou acrescentando-se hidroxireia ao meio de cultura.

Medição LSC de UDS: Antes de proceder ao tratamento com a substância a testar, bloqueia-se a entrada das células na fase S da forma descrita acima; expõem-se em seguida as células à substância a testar, como descrito para a auto-radiografia. No fim do período de incubação extrai-se o ADN das células e determina-se a quantidade total de ADN bem como a quantidade de ³H-TdR incorporada.

É preciso notar que, se forem utilizados linfócitos humanos, não é necessário suprimir a replicação semiconservativa do ADN nas culturas não estimuladas.

Análise

Determinações auto-radiográficas

Para determinar a UDS nas células em cultura não se contam os núcleos em fase -S. Deverão contar-se pelo menos 50 células por concentração. As lâminas serão codificadas antes da contagem. Em cada lâmina serão contados vários campos escolhidos ao acaso, suficientemente afastados uns dos outros. Determinar-se-á a quantidade de ^3H -TdR incorporado no citoplasma contando-se três superfícies do tamanho do núcleo no citoplasma de cada célula contada.

Determinação LSC

Nas determinações LSC-UDS deveria utilizar-se um número adequado de culturas para cada concentração e para os controlos.

Todos os resultados serão confirmados por experiências independentes.

2. RESULTADOS

O resultados deverão ser apresentados sob a forma de quadros.

2.1. Determinações auto-radiográficas

A quantidade de ^3H -TdR incorporada no citoplasma, bem como o número de grãos contados por núcleo celular, serão registados separadamente.

A média, a mediana e a moda podem ser utilizadas para descrever a distribuição da quantidade de ^3H -TdR incorporado no citoplasma, bem como o número de grãos por núcleo.

2.2. Determinação LSC

Para as determinações LSC a incorporação de ^3H -TdR deverá ser indicada sob a forma dpm/ug do ADN. Pode utilizar-se a média dos dpm/ug do ADN com o seu desvio-padrão para descrever a distribuição da incorporação.

Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório

O relatório deverá conter as seguintes informações:

- células utilizadas, densidade e número de passagens na ocasião do tratamento, número de culturas celulares,
- métodos utilizados na manutenção das culturas, incluindo o meio, a temperatura e a concentração de CO_2 ,
- substância a testar, veículo, concentrações e justificação da escolha das concentrações usadas no teste,
- pormenores relativos aos sistemas da activação metabólica,
- esquema do tratamento,
- controlos positivos e negativos,

- técnica de auto-radiografia utilizada,
- métodos utilizados para bloquear a entrada das células na fase S,
- técnicas utilizadas para extração do ADN e determinação da quantidade total de ADN nas determinações LSC,
- relação dose/resposta, se possível,
- avaliação estatística,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 19

TESTE *IN VITRO* DE TROCA ENTRE CROMÁTIDES DO MESMO CROMOSSOMA

(Sister Chromatid Exchange — SCE)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O ensaio de troca entre cromátides do mesmo cromossoma (SCE) constitui um teste de curto prazo, que se destina a detectar as trocas recíprocas de ADN entre as cromátides de um mesmo cromossoma em duplicação. As SCEs representam a troca recíproca de produtos de replicação do ADN em *loci* aparentemente homólogos. O processo de troca implica provavelmente uma cisão e uma fusão do ADN, apesar de sabermos pouco acerca da sua base molecular. Para detectar as SCEs é necessário poder marcar separadamente as cromátides do mesmo cromossoma; isto é possível pela incorporação da bromodesoxiuridina (BrdU) no ADN cromossómico durante dois ciclos celulares.

As células de mamífero *in vitro* são expostas à substância a testar na presença e na ausência dum sistema exógeno de activação metabólica de mamífero, se for caso disso, e colocadas num meio de cultura contendo (BrdU) durante dois ciclos de replicação. Após tratamento com um inibidor do fuso (por exemplo: colchicina) a fim de acumular as células numa fase da mitose *metafase-like* (c-metáfase) recolhem-se as células e fazem-se preparações de cromossomas.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

- podem ser utilizadas no ensaio culturas primárias (linfócitos humanos) ou linhas celulares estabelecidas (por exemplo: células de ovário de hamster chinês). As linhas celulares deverão ser examinadas para detectar uma eventual contaminação por *Mycoplasma*,
- serão utilizados meios de cultura e condições de incubação adequados (por exemplo: temperatura, recipientes de cultura, concentração em CO₂ e humidade),
- as substâncias a testar podem ser preparadas nos meios de cultura, dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados antes de proceder ao tratamento das células. A concentração final do veículo no meio de cultura não deverá afectar nem a viabilidade das células nem a taxa de crescimento, e os efeitos sobre a frequência de SCEs serão verificados por meio de um solvente de controlo,
- as células serão expostas à substância a testar na presença e na ausência de um sistema exógeno de activação metabólica de mamífero. Quando se utilizarem tipos celulares com actividade metabólica intrínseca, a taxa e a natureza dessa actividade deverão ser adequadas à classe química testada.

Condições experimentais

Número de culturas

Serão utilizadas pelo menos duas culturas separadas para cada ponto experimental.

Utilização de controlos negativos e positivos

Deverão ser incluídos em cada experiência controlos positivos utilizando uma substância com acção directa e uma substância necessitando de activação metabólica; deverá também utilizar-se um controlo para o veículo.

As substâncias seguintes podem, por exemplo, ser utilizadas como controlos positivos:

- substância com acção directa:
 - etilmetanosulfonato de etilo,
- substância com acção indirecta:
 - ciclofosfamida.

Se for caso disso, pode incluir-se um controlo positivo suplementar pertencendo à mesma classe química da substância a testar.

Concentração de exposição

Deveriam ser utilizadas pelo menos três concentrações da substância a testar, convenientemente espaçadas. A concentração máxima deverá produzir um efeito tóxico significativo mas permitindo ainda uma replicação celular adequada. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade com métodos apropriados. No caso de substâncias não tóxicas francamente solúveis na água a concentração máxima da substância a testar deverá ser determinada caso a caso.

Procedimento

Preparação das culturas

Utilizam-se linhas celulares estabelecidas provenientes de culturas «mãe» (por exemplo, por tripsinização ou por agitação), semeadas em recipientes de cultura, numa densidade adequada e incubadas a 37 °C. No caso de culturas em monocamada, o número de células por recipiente deveria ser ajustado de forma a que as culturas não estejam confluentes a mais de 50 % no momento da colheita. As células podem também ser utilizadas na forma de cultura em suspensão. As culturas de linfócitos humanos são preparadas a partir de sangue heparinizado utilizando técnicas apropriadas e incubadas a 37 °C.

Tratamento

São expostas à substância a testar células em fase exponencial de crescimento, durante um lapso de tempo adequado; na maior parte dos casos uma a duas horas podem ser suficientes, mas, nalguns casos, o tratamento pode ser prolongado para cobrir até dois ciclos celulares completos.

As células que não tiverem actividade metabólica intrínseca suficiente deverão ser expostas à substância a testar na presença e na ausência dum sistema de activação metabólica apropriado. No fim do período de exposição, as células são lavadas de forma a eliminar a substância testada, e depois cultivadas na presença de BrdU durante dois ciclos de replicação. Um outro método consiste na exposição simultânea das células à substância testada e à BrdU durante dois ciclos celulares completos.

As culturas de linfócitos humanos são tratados enquanto se encontrarem num estado de semi-sincronização.

As células são analisadas no decurso da segunda divisão após tratamento, garantindo assim a exposição das fases mais sensíveis de ciclo celular à substância a testar. Todas as culturas a que se adicionou BrdU serão manipuladas na obscuridade ou com pouca iluminação proveniente de lâmpadas incandescentes até ao momento da colheita das células, para reduzir a fotólise do ADN contendo BrdU.

Colheita das células

As culturas de células são tratadas com um inibidor do fuso (por exemplo: colchicina) uma a quatro horas antes da colheita. Cada cultura é colhida e processada separadamente para a preparação dos cromossomas.

Preparação dos cromossomas e coloração

As preparações de cromossomas são feitas com métodos *standard* de citogenética. Podem utilizar-se várias técnicas para corar as lâminas de forma a pôr em evidência as SCEs (por exemplo: o método por fluorescência mais Giemsa).

Análise

O número de células analisado será em função da frequência espontânea controlo de SCE. Habitualmente analisam-se pelo menos 25 metafases de boa qualidade, por cultura, para contar as SCEs. As lâminas são codificadas antes da análise. Para os linfócitos humanos apenas são analisadas as metafases contendo 46 centrómeros. Para as linhas celulares estabelecidas, apenas são analisadas as metafases com ± 2 centrómeros que o número modal. Deverá ser precisado se uma inversão de coloração ao nível do centrómero é ou não considerada como SCE. Os resultados serão confirmados por uma experiência independente.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser apresentados em quadros. O número de SCEs por metafase e o número de SCEs por cromossoma são dados separadamente para todas as culturas, tratadas e controlos.

Os resultados serão analisados com métodos estatísticos adequados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório deveria conter as informações seguintes:

- células utilizadas, métodos de manutenção da cultura celular,
- condições experimentais: composição de meios, concentração de CO₂, concentração da substância a testar, veículo utilizado, temperatura de incubação, tempo de tratamento, inibidor do fuso utilizado, concentração e duração do tratamento com este, tipo de sistema de activação de mamífero utilizado, controlos positivos e negativos,
- número de culturas celulares por ponto experimental,
- pormenores relativos à técnica utilizada na preparação das lâminas,
- número de metafases analisadas (resultados indicados separadamente para cada cultura),
- número médio de SCEs por célula e por cromossoma (resultados indicados separadamente para cada cultura),
- critério de contagem de SCEs,
- justificação da escolha das doses,
- relação dose/resposta, se possível,
- avaliação estatística,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 20

TESTE DE LETALIDADE RECESSIVA LIGADA AO SEXO NA *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O teste de letalidade recessiva ligada ao sexo (SLRL — Sex Linked Recessive Letal Test) utilizando a *Drosophila melanogaster* detecta a ocorrência de mutações — mutações pontuais bem como pequenas deleções — na linha germinal do insecto. Esta prova é um ensaio de mutação *forward* capaz de detectar mutações em cerca de 800 loci do cromossoma X, o que representa cerca de 80 % de todos os loci deste cromossoma. O cromossoma X representa cerca de um quinto do genoma haplóide completo.

As mutações do cromossoma X de *Drosophila melanogaster* são expressas fenotipicamente nos machos portadores do gene mutante. Quando a mutação é letal no estado hemizigótico, a sua presença é deduzida a partir da ausência de um dos grupos de descendência masculina, em vez dos dois habitualmente produzidos por uma fêmea heterozigótica. O SLRL baseia-se nestes factos, utilizando cromossomas especificamente marcados e com rearranjos da sua estrutura.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Stocks

Podem ser utilizados machos dum *stock* de tipo selvagem bem definido e fêmeas do *stock* Muller-5. Podem também ser utilizados outros *stocks* de fêmeas marcadas adequadamente, com cromossomas X invertidos de forma múltipla.

Substância a testar

As substâncias a testar devem ser dissolvidas em água. As substâncias insolúveis na água podem ser dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados (por exemplo: uma mistura de etanol com Tween-60 ou 80) sendo depois diluídas em água ou numa solução salina antes da administração. Deve evitar-se como veículo o dimetilsulfóxido (DMSO).

Número de animais

O teste deve ser concebido com uma sensibilidade e grau de significância pré-estabelecido. A frequência de mutantes espontâneos observada no grupo de controlo irá influenciar fortemente o número de cromossomas tratados que devem ser analisados.

Via de administração

A administração pode ser oral, por injeção ou por exposição a gases ou vapores. A ingestão da substância testada pode ser feita por intermédio duma solução açucarada. Se necessário as substâncias podem ser dissolvidas numa solução de NaCl a 0,7% e injectadas no tórax ou no abdómen.

Uso de controlos negativos e positivos

Devem ser incluídos controlos negativos (veículo) e positivos. No entanto, se existirem dados apropriados de experiências anteriores, não são necessários controlos simultâneos.

Níveis de exposição

Devem utilizar-se três níveis de exposição. Para uma avaliação preliminar pode utilizar-se apenas uma única concentração da substância testada, podendo essa ser a concentração máxima tolerada ou a concentração produzindo alguns sinais de toxicidade. No caso de substâncias não tóxicas deverá utilizar-se a concentração máxima praticável.

Procedimento

Tratam-se com a substância a testar machos de fenótipo selvagem (com três a cinco dias de idade) sendo acasalados individualmente a um maior número de fêmeas virgens do *stock* Muller-5 ou outro *stock* marcado de forma apropriada (com cromossomas X invertidos de forma múltipla). Estas fêmeas serão substituídas de dois em dois ou de três em três dias por outras fêmeas virgens para se cobrir o ciclo germinal completo. A descendência destas fêmeas é examinada para detectar os efeitos sobre o esperma maduro, as espermátides em estádios precoces, intermédios ou tardios, os espermátócitos e as espermátogónias na ocasião do tratamento.

As fêmeas F₁ heterozigóticas provenientes dos cruzamentos mencionados acima são acasaladas individualmente (isto é, um fêmea por frasco de experiência) com os seus irmãos. Na geração F₂ examina-se cada cultura para detectar a ausência de machos do tipo selvagem. Se uma cultura revelar ser proveniente de uma fêmea F₁ portadora de um gene letal no cromossoma X paterno (isto é, quando não se observar nenhum macho portador do cromossoma tratado) devem testar-se as filhas dessa fêmea com o mesmo genótipo, para verificar se a letalidade se repete na geração seguinte.

2. RESULTADOS

Os resultados devem ser apresentados em quadros indicando o número de cromossomas X tratados, o número de machos não férteis e o número de cromossomas letais por cada concentração de exposição e por cada período de acasalamento para cada macho tratado. O número de agregados de diferentes dimensões deverá ser indicado. Estes resultados deverão ser confirmados por uma experiência separada.

Deverão ser utilizados métodos estatísticos apropriados na avaliação dos testes de letalidade recessiva ligada ao sexo. O reagrupamento de genes letais recessivos provenientes dum único macho deverá ser considerado e avaliado com um método estatístico apropriado.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

- *stock*: *stocks* ou estirpes de *Drosophila* utilizados, idade dos insectos, número de machos tratados, número de machos estéreis, número de culturas F₂ estabelecidas, número de cromossomas portadores dum gene letal detectado em cada estádio das células germinais,
- critérios aplicados para determinar as dimensões dos grupos tratados,
- condições experimentais: descrição pormenorizada do esquema de tratamento e de amostragem, níveis de exposição, dados sobre a toxicidade, controlos negativos (solvente) e positivos se necessário,
- critérios aplicados na contagem das mutações letais,
- relação exposição/efeito, se possível, e avaliação estatística dos resultados,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 21
TESTES DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Podem utilizar-se sistemas de cultura de células de mamífero para detectar *in vitro* alterações do fenótipo induzidas por substâncias químicas associadas com uma transformação maligna *in vivo*. Entre as culturas mais frequentemente utilizadas contam-se as C3H10T 1/2, 3T3, SHE, rato Fischer; os testes baseiam-se nas alterações da morfologia celular, formação de ninhos celulares ou alterações ligadas à necessidade de ancoragem a um agar semi-sólido. Existem outros sistemas menos frequentemente utilizados que detectam outras alterações fisiológicas ou morfológicas nas células depois de uma exposição a carcinogénios químicos. Nenhum dos fenómenos finais destes testes *in vitro* apresenta uma relação mecanicista estabelecida com o cancro. Alguns dos sistemas de testes são capazes de detectar promotores de tumores. Pode determinar-se a citotoxicidade medindo o efeito da substância a testar sobre a capacidade para formar uma colónia (eficácia de *cloning*) ou ainda sobre as taxas de crescimento das culturas. A medição da citotoxicidade tem por fim determinar se a exposição da substância testada foi toxicologicamente significativa mas não pode servir para calcular a frequência das transformações em todas as provas uma vez que algumas destas podem implicar uma incubação prolongada e/ou uma nova passagem.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Células

Podem ser utilizadas várias linhas celulares ou células primárias, dependendo do teste de transformação utilizado. O investigador deve assegurar-se de que as células do teste efectuado apresentam a alteração fenotípica adequada depois da exposição a carcinogénios conhecidos e que a validade e fiabilidade do teste efectuado no seu laboratório sejam comprovadas e documentadas.

Meio

Deverão utilizar-se meios e condições de ensaio adequados ao teste de transformação utilizado.

Substância a testar

As substâncias a testar podem ser preparadas nos meios de cultura, e dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados antes do tratamento das células. A concentração final do veículo no sistema de cultura não deve afectar a viabilidade celular nem a taxa de crescimento, nem a incidência de transformações.

Activação metabólica

As células deverão ser expostas à substância a testar na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica adequado. Alternativamente, quando se utilizar tipos de células com actividade metabólica intrínseca, a natureza dessa actividade será comprovadamente apropriada à classe química testada.

Condições do ensaio

Utilização de controlos positivos e negativos

Serão incluídos em cada experiência controlos positivos utilizando uma substância com acção directa e uma substância necessitando de activação metabólica; utilizar-se-á igualmente um controlo negativo (veículo).

Podem ser utilizadas como controlos positivos as seguintes substâncias:

- substâncias químicas com acção directa:
 - etilmetanosulfonato,
 - β — propiolactona,
- substâncias necessitando de activação metabólica:
 - 2 — acetilaminofluoreno,
 - 4 — dimetilaminobenzeno,
 - 7,12 — dimetilbenzotraceno.

Deverá ser incluído, quando justificado, um controlo positivo suplementar pertencendo à mesma classe química que a substância testada.

Concentrações de exposição

Deverão ser utilizadas várias concentrações das substâncias a testar. Estas concentrações deverão produzir um efeito tóxico dependente da concentração; a concentração máxima deverá produzir uma baixa taxa de sobrevivência, a concentração mínima uma taxa de sobrevivência próxima da observada nos controlos negativos. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade com métodos apropriados. No caso de substâncias não tóxicas, francamente solúveis na água, a concentração máxima deverá ser determinada caso a caso.

Procedimento

As células serão expostas durante um período de tempo dependente do sistema celular utilizado, que pode implicar um novo tratamento acompanhado de mudança de meio (e se necessário uma nova mistura de activação metabólica) se a exposição for prolongada. As células que não tenham actividade metabólica intrínseca suficiente deverão ser expostas à substância a testar na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica apropriado. No fim do período de exposição, as células são lavadas de forma a eliminar a substância testada e cultivadas em condições que permitam o aparecimento do fenótipo transformado em estudo sendo então determinada a incidência desta transformação. Todos os resultados deverão ser confirmados por uma experiência independente.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser apresentados em quadros e podem ser apresentados de várias formas consoante o método utilizado, por exemplo, contagem por placa, placas positivas ou número de células transformadas. Quando apropriado, a sobrevivência será expressa em percentagem das taxas de controlo e a frequência de transformação corresponderá ao número de células transformadas por número de sobreviventes. Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

- tipo de célula utilizada, número de culturas de células, métodos de manutenção das culturas de células,
- condições do teste: concentração da substância a testar, veículo usado, tempo de incubação, duração e frequência do tratamento, densidade celular durante o tratamento, tipo de sistema exógeno de activação metabólica utilizado, controlos positivos e negativos, especificação do fenótipo estudado, sistema selectivo usado (se apropriado); justificação da escolha das doses,

- método utilizado para contar as células viáveis e as transformadas;
- avaliação estatística,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 22

TESTE DE LETALIDADE DOMINANTE NO ROEDOR

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

A letalidade dominante provoca a morte do embrião ou do feto. A indução de letalidade dominante por exposição a uma substância química indica que a substância afectou o tecido germinal da espécie estudada. Admite-se geralmente que a letalidade dominante é devida a uma lesão cromossómica (alterações estruturais e numéricas). No caso dos animais tratados serem fêmeas a morte do embrião pode também ser devida a efeitos tóxicos.

Em geral, os machos são expostos à substância a testar e acasalados com fêmeas virgens não tratadas. Os diferentes estádios das células germinais podem ser testados separadamente utilizando-se períodos de acasalamento sequenciais. O aumento do número de implantes mortos por fêmea no grupo tratado em relação ao número de implantes mortos por fêmea no grupo de controlo reflecte as perdas após a implantação. As perdas antes da implantação podem ser calculadas por contagem dos corpos amarelos ou comparando o número total de implantes por fêmea no grupo tratado e no grupo de controlo. O efeito total de letalidade dominante é igual à soma das perdas antes e depois da implantação. O cálculo do efeito total da letalidade dominante baseia-se na comparação entre o número de implantes vivos por fêmea no grupo tratado e o registado no grupo de controlo. Uma diminuição do número dos implantes em determinados intervalos pode ser devida à destruição das células (isto é, de espermatócitos e/ou espermatogónias).

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Quando for possível, as substâncias a testar serão dissolvidas ou colocadas em suspensão numa solução salina isotónica. As substâncias químicas insolúveis na água podem ser dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados. O veículo utilizado não deverá interferir com a substância a testar nem deverá produzir efeitos tóxicos. Serão utilizadas preparações frescas da substância a testar.

Condições experimentais

Via de administração

A substância a testar deverá ser administrada uma única vez. Pode ser utilizado um programa de tratamento repetido em função das informações toxicológicas disponíveis. As vias de administração habituais são a intubação oral ou a injeção interperitoneal. Podem ser adequadas outras vias de administração.

Animais de experiência

Recomenda-se a utilização de ratos ou ratinhos. Repartem-se ao acaso entre os grupos tratados e de controlo animais jovens e são tendo atingido a plena maturidade sexual.

Número e sexo

Utiliza-se um número adequado de machos tratados, tendo em conta a frequência espontânea da característica biológica que está a ser avaliada. O número escolhido deverá basear-se numa sensibilidade de detecção e grau de significação pré-estabelecidos. Por exemplo, num teste típico, o número de machos escolhido para cada grupo de dose deverá ser suficientemente grande para obter 30 a 50 fêmeas grávidas por período de acasalamento.

Utilização de controlos negativos e positivos

Deverão ser incluídos em cada experiência controlos positivos e negativos (veículos) sendo geralmente simultâneos. Se experiências recentes efectuadas no mesmo laboratório tiverem dado resultados aceitáveis com os controlos positivos, estes resultados poderão ser utilizados em vez dum controlo positivo simultâneo. No que respeita às substâncias de controlo positivo deverá utilizar-se uma dose baixa apropriada (por exemplo MMS, intraperitonealmente, 10 mg/kg) para demonstrar a sensibilidade do teste.

Doses

Normalmente usam-se três níveis de dose diferentes. A dose máxima deverá produzir sinais de toxicidade ou reduzir a fecundidade dos animais tratados. Em alguns casos pode ser suficiente uma única dose elevada.

Ensaio limite

As substâncias não tóxicas são testadas à razão de 5 g/kg no caso de administração única e de 1 g/kg/dia no caso de administração repetida.

Procedimento

Vários esquemas de tratamento são possíveis. O método mais frequente é o da administração única. Podem utilizar-se outros esquemas de tratamento.

Cada macho é acasalado sequencialmente com uma ou duas fêmeas virgens não tratadas, a intervalos de tempo apropriados após o tratamento. As fêmeas deverão ser deixadas com os machos durante pelo menos um ciclo completo do estro, ou até que o acasalamento seja comprovado pela presença de esperma na vagina ou pela presença de um rolhão vaginal.

O número de acasalamentos após tratamento é determinado pelo esquema de tratamento e deverá assegurar que sejam testados todos os estádios das células germinais tratadas.

As fêmeas são sacrificadas durante a segunda metade da gestação e o conteúdo do útero é examinado para determinação do número de implantes vivos e mortos. Os ovários podem ser examinados para determinar o número de corpos amarelos.

2.

RESULTADOS

Os resultados deverão ser apresentados em quadros, indicando o número de machos, o número de fêmeas grávidas bem como o número de fêmeas não grávidas. Os resultados de cada acasalamento incluindo a identidade de cada macho e de cada fêmea são apresentados separadamente. Serão descritos para cada fêmea a semana de acasalamento e a dose recebida pelos machos, bem como a frequência dos implantes vivos e mortos.

O cálculo do efeito total de letalidade dominante baseia-se numa comparação do número de implantes vivos por fêmea no grupo tratado com o número de implantes vivos por fêmea no grupo de controlo. Compara-se a relação implantes vivos/mortos no grupo tratado com a mesma relação no grupo de controlo para indicação das perdas pós-implantação.

Se os resultados forem registados sob a forma de mortalidades precoces e mortalidades tardias, os quadros deverão tornar clara essa diferença. Se for avaliada a perda anterior à implantação, devem apresentar-se os resultados. Esta perda pode ser calculada como a discrepância entre o número de corpos amarelos e o número de implantes ou como a diminuição do número médio de implantes por fêmea em relação ao dos acasalamentos de controlo. Os resultados serão avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as informações seguintes:

- espécies, estirpe, idade e peso dos animais utilizados, número de animais de cada sexo nos grupos tratados e de controlo,
- substância a testar, veículo, doses testadas e justificação da escolha das doses, controlos negativos e positivos, dados relativos à toxicidade,
- via de administração e esquema do tratamento,
- esquema de acasalamento,
- método utilizado para comprovar o acasalamento,
- momento do sacrifício,
- critérios de contagem dos efeitos de letalidade dominante,
- relação dose/resposta, se possível,
- avaliação estatística,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

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

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 483 - Ensaio de aberração cromossómica em espermátogónias de mamífero (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do ensaio *in-vivo* de aberrações cromossómicas em espermátogónias de mamífero é identificar as substâncias que causam aberrações cromossómicas estruturais nas células espermátogónias de mamífero (1) (2) (3) (4) (5). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, cromossómicas ou cromatídicas. A maior parte dos mutagénicos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. O método não foi concebido para medir aberrações numéricas e não é normalmente utilizado com esse objectivo. As mutações cromossómicas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas.

O presente ensaio mede eventos a nível dos cromossomas de células germinais espermátogónias e, por conseguinte, pressupõe-se que tenha um carácter de previsão da indução de mutações transmissíveis nas células germinais.

No presente ensaio utilizam-se normalmente roedores. O ensaio citogénico *in-vivo* detecta aberrações cromossómicas nas mitoses das espermátogónias. O método não diz respeito a outros tipos de células.

Para detectar aberrações cromatídicas em células espermátogónias, deve examinar-se a primeira divisão mitótica da célula após a exposição, antes que as eventuais lesões sejam perdidas por via de divisões celulares subsequentes. Para obtenção de informação adicional sobre as células germinais das espermátogónias expostas pode proceder-se à análise dos cromossomas durante a meiose, para detecção de aberrações cromossómicas na diacinese-metafase I, momento em que as células expostas passam à forma de espermátócitos.

O presente ensaio *in-vivo* foi concebido para investigar se os agentes mutagénicos das células somáticas também são activos para as células germinais. Além disso, o ensaio das espermátogónias é relevante para a avaliação dos riscos de mutagenicidade, na medida em que permite a consideração dos elementos do metabolismo *in-vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN.

Nos testículos estão presentes diversas gerações de espermátogónias, com diferentes graus de sensibilidade ao tratamento químico. Logo, as aberrações detectadas representam uma resposta agregada das várias populações de células espermátogónias expostas, com predominância para as células espermátogónias mais diferenciadas, que são em maior número. Dependendo da sua posição no testículo, diferentes gerações de espermátogónias poderão ou não ser expostas à circulação geral, devido à barreira física e fisiológica constituída pelas células de Sertoli e à barreira sangue-testículo.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

Ver também a Parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

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

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico das células utilizadas.

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

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais são expostos à substância em estudo através de um modo de exposição apropriado, sendo sacrificados passado o tempo necessário após a exposição. Antes do sacrifício, os animais são tratados com um agente de fixação da metafase (p.ex.: colchicina ou Colcemid®). Seguidamente, são feitas preparações de cromossomas a partir das células germinais e, após serem coradas, as células em metafase são analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. Preparação

1.4.1.1. *Seleção das espécies animais*

Geralmente, são utilizados ratos ou hamster chineses machos, embora possam ser utilizados machos de qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder $\pm 20\%$ do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, Parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50-60%.

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais machos adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o estudo.

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do Ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/Veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, não devendo produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solventes/veículos aquosos.

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo). Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir aberrações estruturais *in vivo* nas células espermatogónias quando administrados aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base.

A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Substância	Nº CAS	Nº EINECS
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
Ciclohexilamina	108-91-8	203-629-0
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Acrilamida monomérica	79-06-1	201-173-7
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Para cada amostragem prevista, devem ser incluídos controlos negativos expostos apenas ao solvente ou veículo que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Além disso, devem ser também preparados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados de controlo históricos ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. Número de animais

Cada grupo exposto e de controlo deve incluir pelo menos 5 animais machos analisáveis.

1.5.2. Programação do tratamento

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa ou em duas doses (ou seja, numa só exposição ou em duas exposições). As substâncias poderão igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes. Qualquer outro regime de administração terá de ser cientificamente justificado.

No grupo exposto à dose mais elevada, serão realizadas duas amostras após a exposição. Uma vez que a cinética celular poderá ser afectada pela substância em estudo, serão colhidas duas amostras, uma cerca de 24 horas após a exposição e outra cerca de 48 horas após a exposição. Para os restantes animais, deve ser colhida uma amostra 1,5 ciclos celulares normais ou 24 horas após a exposição, a não ser nos casos em que se saiba que a utilização de outros tempos de amostragem é mais apropriada para a detecção dos efeitos (6).

Para além disso, poderão ser utilizados outros tempos de amostragem. Assim, por exemplo, no caso de produtos químicos que possam induzir *lagging* cromossómico ou efeitos independentes do factor S, poderá ser necessário fazer a amostragem mais cedo (1).

A necessidade ou não de uma repetição da exposição terá de ser avaliada caso a caso. Se o tratamento for repetido, os animais devem ser sacrificados 24 horas (1,5 ciclos celulares) após a última exposição. Quando necessário, poderão ser realizadas amostras adicionais.

Antes do sacrifício, os animais são injectados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um agente de fixação da metafase (p.ex.: Colcemid® ou colchicina). As amostras serão colhidas a intervalos regulares a partir desse momento. Esse intervalo corresponde a aproximadamente 3-5 horas para os ratos e a 4-5 horas para os hamster chineses.

1.5.3. Doses

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular e regime de exposição a utilizar no estudo principal (7). Se existir toxicidade, serão utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem. Essas doses devem abranger uma gama de toxicidade máxima a quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose mais elevada. A dose mais elevada é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade.

As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não-tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas numa base casuística. A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade nas espermatogónias (p.ex.: redução da taxa de mitose das espermatogónias na primeira e segunda metafases meióticas; esse redução não deve ser superior a 50%).

1.5.4. **Ensaio limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injeção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injeção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante para todas as doses a administrar.

1.5.6. **Preparação dos cromossomas**

Imediatamente após o sacrifício, devem ser preparadas suspensões celulares de um ou de ambos os testículos, que serão seguidamente exposta a uma solução hipotónica e fixadas. As células são depois esfregadas em lâminas e coradas.

1.5.7. **Análise**

Devem ser analisadas pelo menos 100 células em metafase avançada de cada animal (ou seja, um mínimo de 500 metafases por grupo). Este número poderá ser menor quando se verificarem taxas elevadas de aberrações. Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os procedimentos de preparação das lâminas dão frequentemente lugar à ruptura de uma certa proporção das células em metafase, com perda de cromossomas, as células contabilizadas devem conter um número de centrómeros igual a $2n \pm 2$.

2. **DADOS**

2.1. **TRATAMENTO DOS RESULTADOS**

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal, devem ser verificados o número de células com aberrações cromossómicas e o número de aberrações cromossómicas por célula. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados com os respectivos números e frequências para os grupos expostos à substância em estudo e de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações.

Se para além das mitoses também se observarem meioses, a relação entre o número de mitoses e de metafases I ou II das espermatogónias deve ser determinada num total de 100 células em divisão por animal, para medição da citotoxicidade em todos os animais expostos à substância em estudo e do controlo negativo, de forma a poder estabelecer se existem efeitos citotóxicos. Se só se observarem mitoses, o índice mitótico deve ser calculado utilizando pelo menos 1000 células de cada animal.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, como por exemplo um aumento do número de células com aberrações cromossômicas relacionado com a dose ou um claro aumento do número de células com aberrações num determinado grupo e numa determinada amostragem. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (8), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva.. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não-mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio *in vitro* para aberrações cromossômicas em espermatogónias indica que a substância em estudo induz aberrações cromossômicas estruturais nas células germinais das espécies testadas. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossômicas estruturais nas células germinais das espécies testadas.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo.

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

- justificação para a escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida;

Animais de ensaio:

- espécie/linha celular utilizada;
- número e idade dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo;

Condições de ensaio:

- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado;
- justificação para a selecção das doses;
- justificação da via de administração escolhida;
- preparação da substância em estudo;
- modo de administração da substância em estudo;
- justificação do momento do sacrifício;
- conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável;
- qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada dos calendários de tratamento e amostragem;
- métodos de medição da toxicidade;
- substância utilizada para fixar a metafase, respectiva concentração e duração da exposição;
- métodos de preparação das lâminas;
- critérios de contabilização das aberrações;
- número de células analisadas por animal;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- índice mitótico;
- proporção de células espermatogónias em mitose em relação às células em metafase I ou II;
- tipo e número de aberrações, discriminados para cada animal;
- número total de aberrações por grupo;
- número de células aberrantes por grupo;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio;
- dados históricos sobre o controlo negativo, com as respectivas gama, valor médio e desvio-padrão;
- dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio.
- alterações da ploidia, quando observadas;

Discussão dos resultados.

Conclusões.

BIBLIOGRAFIA

1. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
2. Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
3. Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Ensaio. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.
4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
5. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Espermatozóicas Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.
6. Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
7. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.
8. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 24

TESTE DAS MALHAS (SPOT-TEST) NO RATINHO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Este teste é uma prova *in vivo* efectuada no ratinho, cujos embriões em desenvolvimento são expostos à substância a testar. As células visadas dos embriões em desenvolvimento são os melanoblastos e os genes alvo são os responsáveis pela pigmentação do pêlo. Os embriões em desenvolvimento são heterozigóticos para alguns desses genes. Uma mutação ao nível do alelo dominante ou a perda do alelo dominante de um desses genes num melanoblasto (na sequência de vários fenómenos genéticos) traduz-se pela expressão do fenótipo recessivo nas células que dele descendem, do que resulta o aparecimento de uma malha de cor diferente no pêlo do ratinho. Conta-se assim o número de descendentes portadores de malhas (mutações) e a sua frequência é comparada com a frequência observada na descendência resultante do desenvolvimento de embriões tratados apenas com o solvente. O teste das malhas no ratinho (*spot test*) detecta as mutações somáticas presumíveis nas células fetais.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Quando for possível as substâncias a testar são dissolvidas ou colocadas em suspensão numa solução salina isotónica. As substâncias insolúveis na água serão dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados. O veículo utilizado não deverá interferir com a substância a testar nem produzir efeitos tóxicos. Deverão utilizar-se soluções preparadas de fresco da substância a testar.

Animais de experiência

Ratinhos da estirpe T (*nonagouti*, a/a; *chinchilla*, *pink eye*, c^{hp}/c^{hp} ; *brown*, b/b; *dilute*, *short ear*, d se/d se; *piebald spotting*, s/s) são acasalados seja com a estirpe HT (*pallid*, *nonagouti*, *brachypody*, pa a/bp/pa a/bp; *leaden fuzzy*, ln fz/ln fz; *pearl* pe/pe) ou com a C57 BL (*nonagouti*, a/a). Podem utilizar-se outros cruzamentos apropriados como entre a NMRI (*nonagouti*, a/a; albino; c/c) e a DBA (*nonagouti*, a/a; *brown*, b/b; *dilute*, d/d) na condição de produzirem uma descendência *nonagouti*.

Número e sexo

Deve tratar-se um número suficiente de fêmeas grávidas de forma a obter um número adequado de descendentes vivos para cada dose utilizada. A dimensão da amostra depende do número de malhas observadas nos ratinhos tratados bem como da importância dos dados dos controlos. Só se aceitará um resultado negativo se forem examinados pelo menos 300 descendentes das fêmeas tratadas com a dose máxima.

Controlos negativos e positivos

Deverá dispor-se de dados de controlo simultâneos respeitantes aos ratinhos tratados apenas com o veículo (controlos negativos). Dados de controlo de experiências anteriores provenientes do mesmo laboratório podem

ser-lhes reunidos para se aumentar a sensibilidade do teste, no caso destes serem homogêneos. Se a substância testada não se revelar mutagénica, deveriam estar disponíveis os dados obtidos recentemente pelo mesmo laboratório para um controlo positivo cuja acção mutagénica nesta prova seja conhecida.

Via de administração

As vias de administração habituais nas fêmeas grávidas são a intubação oral e a injeção intraperitoneal. Tratamentos por inalação ou outras vias de administração serão usados quando tal for apropriado.

Doses

Utilizam-se pelo menos dois níveis de dose, um dos quais provocando sinais de toxicidade ou reduzindo o tamanho das ninhadas. No caso de substâncias não tóxicas, recorrer-se-á a um tratamento com a dose máxima praticável.

Procedimento

Administra-se normalmente um tratamento único no dia 8, 9 ou 10 de gestação, sendo o dia 1 aquele em que se observe pela primeira vez a presença de um rolhão vaginal. Estes dias correspondem 7,25, 8,25 e 9,25 dias após a concepção. Podem ser efectuados tratamentos sucessivos durante esses dias.

Análise

Três a quatro semanas após o nascimento a descendência é codificada e examinada para se detectar a presença de malhas. Distinguem-se três classes de malhas:

- a) Malhas brancas situadas a menos de 5 mm da linha médio-ventral que se presume resultarem de morte celular (WMVS);
- b) Malhas amarelas de tipo agouti, associadas aos mamilos, aos órgãos genitais, à garganta, às regiões axilar e inguinal bem como no meio da região frontal, que se presume serem devidas a uma diferenciação defeituosa (MDS); e
- c) Malhas pigmentadas e brancas, distribuídas ao acaso no pêlo, que se presume serem devidas a mutações somáticas (RS).

Contam-se as três classes mas apenas a última, isto é, a RS, tem relevância genética. Os problemas postos pela distinção entre as classes MDS e RS podem ser resolvidos examinando-se amostras de pêlos ao microscópio de fluorescência.

Serão anotadas as alterações macroscópicas evidentes observadas na descendência.

2. RESULTADOS

Os resultados são apresentados indicando o número total de crias examinadas e o número de crias apresentando uma ou várias malhas que se presume serem devidas a uma mutação somática. Os resultados relativos aos animais tratados e aos controlos negativos são comparados por métodos apropriados. Os resultados são apresentados igualmente referindo-se a ninhada como unidade.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

- as estirpes utilizadas no cruzamento,
- o número de fêmeas grávidas nos grupos tratados e de controlo,
- o tamanho médio das ninhadas nos grupos tratados e de controlo na ocasião do nascimento e do desmame,
- as doses da substância a testar,
- o solvente utilizado,

- o dia da gestação em que se administrou o tratamento,
- a via de administração,
- o número total de crias observadas bem como o número das que apresentavam malhas WMVS, MDS e RS nos grupos tratados e de controlo,
- alterações morfológicas macroscópicas,
- relação dose/efeito se possível,
- avaliação estatística,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 25
TRANSLOCAÇÃO HEREDITÁRIA NO RATINHO

1. **MÉTODO**

1.1. **Introdução**

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. **Definição**

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. **Substâncias de referência**

Nenhuma.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

O teste de translocação hereditária no ratinho detecta alterações cromossómicas estruturais e numéricas nas células germinais de mamífero que são postas em evidência na descendência da primeira geração. Os tipos de alterações cromossómicas detectadas são as translocações recíprocas e, se for incluída a descendência do sexo feminino, a perda do cromossoma X. Os portadores de translocações e as fêmeas XO apresentam uma fertilidade reduzida, permitindo a selecção de uma descendência F₁ para análise citogenética. Alguns tipos de translocação provocam esterilidade total (X-autossoma e tipo c-t). As translocações são observadas por métodos citogenéticos nas células meióticas na diacinese-metáfase I de indivíduos do sexo masculino, sejam machos F₁ ou filhos de fêmeas F₁. As fêmeas XO são identificadas citogeneticamente pela presença de apenas 39 cromossomas nas mitoses da medula óssea.

1.5. **CrITÉRIOS qualitativos**

Nenhum.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

Preparativos

As substâncias a testar são dissolvidas numa solução salina isotónica. Se forem insolúveis na água serão dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados. Utilizam-se soluções preparadas de fresco da substância a testar. Se se utilizar um veículo para facilitar a administração este não deve interferir com a substância a testar nem produzir efeitos tóxicos.

Via de administração

As vias de administração são habitualmente a intubação oral ou a injeção intraperitoneal. Podem ser adequadas outras vias de administração.

Animais de experiência

Estas experiências são efectuadas em ratinhos para facilitar a reprodução e a verificação citológica. Não é requerida nenhuma estirpe específica. No entanto, o número médio de crias por ninhada da estirpe utilizada deverá ser superior a oito e ser relativamente constante. Serão utilizados animais sãos tendo já atingido a maturidade sexual.

Número de animais

O número de animais necessários depende da frequência de translocações espontâneas bem como da taxa de indução mínima requerida para um resultado positivo.

O teste consiste habitualmente na análise da descendência masculina F₁. Serão testados pelo menos 500 descendentes masculinos F₁ por cada dose. Se se incluir a descendência feminina F₁, serão necessários 300 machos e 300 fêmeas.

Controlos negativos e positivos

Devem estar disponíveis dados de controlo adequados provenientes de provas realizadas simultaneamente ou de experiências anteriores. Quando existirem dados aceitáveis de controlos positivos provenientes de experiências efectuadas recentemente no mesmo laboratório, estes podem ser utilizados em vez de controlos positivos simultâneos.

Doses

É testada apenas uma dose, tratando-se habitualmente da dose máxima associada à produção de efeitos tóxicos mínimos mas não afectando o comportamento reprodutor nem a sobrevivência. Para estabelecer uma relação dose/resposta são necessárias duas doses adicionais, mais baixas. No caso de substâncias não tóxicas, deverá recorrer-se a uma exposição à dose máxima praticável.

Procedimento

Tratamento e acasalamento

São possíveis dois esquemas de tratamento. A administração única da substância a testar é o método mais frequente. A substância a testar pode também ser administrada sete dias por semana durante 35 dias. O número de acasalamentos depois do tratamento é determinado pelo esquema de tratamento e será tal que todos os estádios de células germinais sejam implicados. No fim do período de acasalamento as fêmeas são colocadas em gaiolas individuais. Quando as fêmeas parirem registar-se-ão a data, o número de crias da ninhada e o sexo das crias. Toda a descendência do sexo masculino é desmamada e toda a do sexo feminino afastada a não ser que esteja incluída na experiência.

Pesquisa dos heterozigóticos de translocação

É utilizado um de dois métodos disponíveis:

- análise da fertilidade da descendência F_1 e verificação ulterior de eventuais portadores de translocações por análise citogenética,
- análise citogenética de todos os machos F_1 sem selecção prévia por verificação da fertilidade.

a) Análise da fertilidade

A diminuição de fertilidade de um indivíduo F_1 pode ser determinada observando-se o número de crias da ninhada e/ou analisando o conteúdo uterino das fêmeas com que acasalou.

Deverão estabelecer-se critérios para determinação da fertilidade normal e diminuída da estirpe de ratinhos utilizada.

Observação do número de animais por ninhada: os machos F_1 a testar são colocados em gaiolas individuais com fêmeas provenientes da mesma experiência ou da colónia. As gaiolas são inspeccionadas diariamente a partir do dia 18 após o acasalamento. O número de crias da ninhada e o sexo da descendência F_2 são registados na ocasião do nascimento, sendo as crias eliminadas em seguida. Se se testar a descendência do sexo feminino F_1 então os descendentes F_2 provenientes de ninhadas pequenas são conservados com vista a uma análise mais profunda. As fêmeas portadoras de uma translocação serão objecto de uma verificação por análise citogenética de uma translocação em qualquer dos seus descendentes machos. As fêmeas XO são identificadas pela alteração da razão macho/fêmea na sua descendência que passa de $1/1$ para $1/2$ machos/fêmeas. Num método sequencial os animais F_1 normais não serão objecto de outra verificação se a primeira ninhada F_2 atingir ou ultrapassar um valor normal pré-estabelecido, senão observar-se-á uma segunda ou uma terceira ninhadas F_2 .

Os animais F_1 que não puderem ser classificados como normais após uma observação de até três ninhadas F_2 no máximo, serão submetidos seja a um novo controlo por análise do conteúdo uterino das fêmeas com que acasalaram, seja submetidos directamente a uma análise citogenética.

Análise do Conteúdo Uterino: a redução do número de crias por ninhada nos portadores de translocação é devida à morte de embriões, de modo que um grande número de implantes mortos indica a presença de uma translocação no animal submetido ao teste. Cada macho F_1 a testar é acasalado com duas ou três fêmeas. A concepção é confirmada pela inspecção matinal diária das fêmeas para detectar a presença de rolhão vaginal. As fêmeas são sacrificadas 14 a 16 dias mais tarde registando-se o número de implantes vivos e mortos presentes nos seus úteros.

b) Análise citogenética

As preparações de testículo são efectuadas pelo método de secagem ao ar. Os portadoras de translocações são identificados pela presença de configurações multivalentes na diacinese-metafase I nos espermatócitos primários. A observação de pelo menos duas células apresentando uma associação multivalente constitui a prova necessária de que o animal testado é portador de uma translocação.

Se não tiver sido efectuada nenhuma selecção por análise de fertilidade, todos os machos F_1 são submetidos a um exame citogenético. Devem ser analisadas ao microscópio um mínimo de 25 células em diacinese-metafase I por macho. É necessário o exame das metafases mitóticas nas espermatogónias ou na medula óssea, no caso dos machos tendo testículos pequenos ou apresentando uma paragem meiótica antes da diacinese ou no caso das fêmeas F_1 suspeitas de serem XO. A presença de um cromossoma anormalmente longo e/ou curto em alguma de 10 células é a prova duma translocação particular acarretando a esterilidade do macho (tipo c-t). Algumas translocações X-autossoma provocando a esterilidade do macho podem apenas ser identificadas por uma análise de bandas de cromossomas mitóticos. A presença de 39 cromossomas em 10 mitoses por cada 10 é a prova de um estado XO numa fêmea.

2. RESULTADOS

Os resultados são apresentados sob a forma de quadros.

O número médio de crias por ninhada e a razão entre os sexos são registados à nascença e no desmame para cada período de acasalamento.

Quando da avaliação da fertilidade dos animais F_1 deverão apresentar-se o número médio de crias por ninhada das ninhadas resultantes de todos os acasalamentos normais bem como o número de crias individual das ninhadas provenientes de animais F_1 portadores de translocação. No que respeita à análise do conteúdo uterino serão anotados o número médio de implantes vivos e mortos resultantes de acasalamentos normais e o número de implantes vivos e mortos para cada acasalamento de animais portadores de translocação.

Quando da análise citogenética da diacinese-metafase I, serão registados os diferentes tipos de configurações multivalentes e o número total de células para cada portador de translocação.

Para os indivíduos F_1 estéreis serão indicados o número total de acasalamentos e a duração do período de acasalamento. Serão indicados o peso dos testículos bem como os pormenores da análise citogenética.

Para as fêmeas XO indicar-se-á o número de crias médio por ninhada, a razão entre os sexos na descendência F_2 , bem como os resultados da análise citogenética.

Se forem seleccionados eventuais portadores de translocação F_1 por testes de fertilidade os quadros deverão mencionar quantos deles foram confirmados como sendo heterozigóticos de translocação.

Serão apresentados os dados relativos aos controlos negativos bem como as experiências de controlo positivo.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

- estirpe de ratinho utilizada, idade dos animais, peso dos animais tratados,
- número de animais progenitores de cada sexo nos grupos tratados e de controlo,
- condições experimentais, descrição pormenorizada do tratamento, doses, solventes, esquema de acasalamento,
- número e sexo de crias por fêmea, número e sexo das crias mantidas para uma análise de translocação,
- momento e critérios da análise de translocação,
- número e descrição pormenorizada dos portadores de translocação, incluindo dados relativos à reprodução e ao conteúdo uterino, se possível,
- métodos citogenéticos e pormenores da análise microscópica, de preferência com fotografias,
- avaliação estatística,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

B.26. ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA

ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ROEDORES COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS

1. MÉTODO

O presente método de ensaio da toxicidade oral subcrónica é idêntico ao método OCDE TG 408 (1998).

1.1 INTRODUÇÃO

Ao avaliarem-se as características tóxicas de uma substância química, poderá proceder-se à determinação da toxicidade oral subcrónica utilizando doses repetidas depois de se ter obtido informação inicial sobre a toxicidade a partir de ensaios de toxicidade aguda ou de dose repetida com a duração de 28 dias. O estudo de 90 dias permite obter informação sobre os perigos para a saúde susceptíveis de decorrer de uma exposição repetida ao longo de um período de tempo prolongado, abrangendo a maturação e o crescimento após o desmame e prolongando-se pela vida adulta. O estudo permitirá obter informação sobre os principais efeitos tóxicos, identificar os órgãos-alvo e a possibilidade de acumulação, bem como fazer uma estimativa de um nível de exposição sem efeitos adversos observados a utilizar na selecção dos níveis de administração em estudos crónicos e na determinação de critérios de segurança para a exposição no caso de seres humanos.

O método utilizado dá um maior destaque aos terminais neurológicos e permite formar uma ideia sobre os efeitos imunológicos e ao nível da reprodução. Deve salientar-se a necessidade de efectuar uma observação clínica pormenorizada dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível. Este estudo deve permitir também identificar substâncias susceptíveis de causar efeitos neurotóxicos, imunológicos ou ao nível dos órgãos de reprodução, que poderão justificar uma investigação mais aprofundada.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2 DEFINIÇÕES

Dose: quantidade de substância administrada. A dose é expressa em termos de massa (g, mg) ou em termos da massa da substância em estudo por massa unitária do animal estudado (por exemplo, mg/kg), ou em termos de concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem: termo geral que abrange a dose administrada, bem como a frequência e duração da administração.

NOAEL: abreviatura de "no observed adverse effect level" ("dose sem efeitos adversos observados"), que consiste na dose máxima ou no nível de exposição máximo que não produz efeitos adversos detectáveis no ensaio atribuíveis ao mesmo.

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada diariamente por via oral, em doses crescentes (uma dose por lote), a vários lotes de animais de ensaio, durante um período de 90 dias. No decurso deste período, os animais são examinados em pormenor, com vista à detecção de quaisquer sinais de toxicidade. Efectua-se a autópsia dos animais que morrem ou são sacrificados durante o ensaio e, no final do mesmo, procede-se ao abate dos sobreviventes e à respectiva autópsia.

1.4 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1 **Preparação dos animais**

Devem ser utilizados animais saudáveis que tenham sido aclimatados às condições laboratoriais durante pelo menos 5 dias e não tenham sido anteriormente submetidos a procedimentos experimentais. Os animais utilizados no estudo devem ser caracterizados quanto à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais devem ser repartidos aleatoriamente pelos grupos de ensaio e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de modo a reduzir ao mínimo os eventuais efeitos devidos à respectiva colocação. Deve ser atribuído a cada animal um número de identificação diferente.

1.4.2 **Preparação das doses**

A substância em estudo é administrada por intermédio de uma sonda gástrica ou através da alimentação ou da água de beber. O método de administração oral depende do objectivo do ensaio, bem como das propriedades físico-químicas da substância em estudo.

Se necessário, a substância é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se que se considere primeiramente a possibilidade de se utilizar uma solução ou suspensão aquosa; em segundo lugar, uma solução ou emulsão em óleo (nomeadamente óleo de milho); e, por último, uma solução noutra veículo. No caso de se utilizar um veículo não-aquoso, devem conhecer-se as respectivas características de toxicidade. Deve também determinar-se a estabilidade da substância nas condições de administração.

1.4.3 **Condições de ensaio**

1.4.3.1 *Animais a utilizar no ensaio*

Embora possa recorrer-se outros roedores, como, por exemplo, o ratinho, o rato constitui a espécie preferida. Devem utilizar-se animais adultos, jovens e saudáveis, de estirpes correntes de laboratório. As fêmeas devem ser nulpáras e não-grávidas. A administração da substância deve ter início logo que possível após o desmame e, em qualquer caso, antes de os animais completarem nove semanas de idade. No início do estudo, a variação de massa dos animais deve ser mínima, não excedendo $\pm 20\%$ da massa média de cada sexo. Caso o estudo preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar em ambos os casos animais da mesma estirpe e proveniência.

1.4.3.2 *Número e sexo*

Para cada dose, devem utilizar-se, pelo menos, 20 animais (10 machos e 10 fêmeas). Caso se preveja o sacrifício de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar. Com base em conhecimentos anteriores da substância em estudo ou de um análogo próximo, deverá considerar-se a possibilidade de incluir um lote extra de dez animais (cinco de cada sexo) no grupo de controlo e no grupo a que irá ser administrada a dose máxima, a fim de se observar, após o período de ensaio, a reversibilidade ou persistência de eventuais efeitos tóxicos. A duração deste período de observação deverá ser correctamente estabelecida tendo em conta os efeitos a observar.

1.4.3.3 *Doses*

Devem ser utilizadas pelo menos três doses e um controlo simultâneo, excepto nos casos em que seja realizado um ensaio-limite (ver 1.4.3.4). As doses poderão basear-se nos resultados de estudos de dose repetida ou de determinação da gama, e deverão levar em conta todos os dados toxicológicos e toxicocinéticos existentes para a substância em estudo ou substâncias afins. A dose máxima deve ser seleccionada com a finalidade de provocar toxicidade, mas não a morte nem um sofrimento excessivo, a não ser que a natureza físico-química ou os efeitos biológicos da substância em estudo determinem que a referida dose seja limitada. Deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos adversos associados à administração da dose mínima (NOAEL). A diferença óptima entre as doses consiste, frequentemente, num factor de 2 a 4; em muitos casos, a utilização de um quarto lote de ensaio é preferível ao recurso a intervalos de grande amplitude (por exemplo, superior a um factor de 6-10) entre as doses.

O grupo de controlo deve ser constituído por animais aos quais não é administrada a substância em estudo ou um grupo de controlo do veículo se for utilizado um veículo para administrar a substância em estudo. Com excepção da exposição à substância em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser manuseados de forma idêntica aos outros animais. Caso se recorra a um veículo para a administração da substância em estudo, deve administrar-se o volume máximo do mesmo aos animais do lote de controlo. Se a substância em estudo for administrada através dos alimentos e causar um menor consumo alimentar, será vantajoso utilizar-se um grupo de controlo alimentado aos pares para se distinguir entre as reduções que se devem à palatabilidade e a alterações toxicológicas no modelo em estudo.

Deverão considerar-se as seguintes características do veículo e outros aditivos, conforme aplicável: efeitos ao nível da absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância em estudo; efeitos nas propriedades químicas da substância em estudo susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos ou água ou no estado nutricional dos animais.

1.4.3.4 *Ensaio-limite*

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1.000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se prevejam efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio completo com três doses. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5 PROCEDIMENTO

1.5.1 **Administração das doses**

A substância é administrada diariamente aos animais durante um período de 90 dias; em casos devidamente justificados, pode proceder-se à administração cinco dias por semana. A administração forçada deve efectuar-se numa dose única, por intermédio de uma sonda gástrica ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode administrar-se de cada vez depende das dimensões do animal. Esse volume não deve exceder 1 ml/100g de massa corporal, excepto no caso de soluções aquosas, em que se poderá utilizar um volume de 2 ml/100g de massa corporal. Salvo no caso de substâncias corrosivas ou irritantes, cujos efeitos são, de modo geral, agravados em concentrações mais elevadas, devem minimizar-se as variações no volume mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante para todas as doses.

Caso a substância em estudo seja administrada através dos alimentos ou da água de beber, deve assegurar-se que as respectivas quantidades não perturbam o equilíbrio nutricional e hídrico normal. Se a substância for administrada com os alimentos, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante, expressa em ppm, ou uma dose constante, expressa em relação à massa corporal dos animais; deve especificar-se a alternativa adoptada. No caso do recurso a uma sonda gástrica, a dose deve ser administrada diariamente à mesma hora e, se necessário, ajustada de modo a manter uma dose constante em relação à massa corporal do animal. Caso um ensaio de 90 dias preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

1.5.2 Observações

O período de observação deve ser de, pelo menos, 90 dias. Os animais incluídos nos lotes extra destinados a observações subseqüentes devem ser mantidos durante um período de tempo suficiente sem administração da substância em estudo de modo a detectar a persistência ou a recuperação dos efeitos tóxicos.

Deve efectuar-se um exame clínico pelo menos uma vez por dia, de preferência à mesma hora, em função do período previsto de efeitos mais agudos devidos à administração da substância, registando-se o estado de saúde dos animais. Todos os animais deverão ser examinados pelo menos duas vezes por dia, normalmente ao princípio e ao fim de cada dia, a fim de se identificarem sinais de morbilidade e mortalidade.

Deve proceder-se a um exame clínico aprofundado de todos os animais pelo menos uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir efectuar comparações para o mesmo indivíduo) e uma vez por semana após a mesma. O exame deve decorrer no exterior da gaiola, num recinto adequado e, de preferência, à mesma hora. As observações devem ser cuidadosamente registadas, de preferência por recurso a um sistema definido em pormenor pelo laboratório em causa. Deve procurar-se assegurar que as variações nas condições de observação sejam mínimas. Os sinais anotados devem incluir, nomeadamente, alterações na pele, no pêlo, nos olhos e nas mucosas, bem como a ocorrência de secreções, excreções ou actividade autónoma (como, por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, alterações nas pupilas, respiração anormal). Devem também registar-se quaisquer alterações da atitude, postura e reacção à manipulação, além da ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e comportamentos estereotipados (por exemplo, actos de higiene repetitivos, movimentos circulares repetitivos) ou estranhos (auto-mutilação, marcha para a retaguarda) (1).

Deve proceder-se a um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou equipamento equivalente adequado, antes de se iniciar a administração da substância em estudo e ao terminar o estudo, de preferência a todos os animais, ou pelo menos aos animais dos grupos de dose máxima e de controlo. Se forem detectadas alterações nos olhos, devem examinar-se todos os animais.

Na fase final do período de exposição, mas, em qualquer caso, nunca antes da 11ª semana, deve proceder-se à avaliação da reactividade sensorial a estímulos de diferentes tipos (1) (por exemplo, estímulos auditivos, visuais e proprioceptivos) (2), (3), (4), avaliação da força de preensão (5) e avaliação da actividade motora (6). Para mais pormenores sobre os procedimentos que se podem utilizar, devem consultar-se as respectivas referências. No entanto, também se poderão adoptar procedimentos alternativos aos indicados nas referências.

As observações funcionais poderão ser omitidas na fase final do estudo quando existirem dados sobre observações funcionais de outros estudos e os exames clínicos realizados diariamente não revelarem quaisquer deficiências funcionais.

Excepcionalmente, podem omitir-se as observações funcionais no caso de lotes que apresentem sinais de toxicidade cuja intensidade seja susceptível de interferir de modo significativo com as mesmas.

1.5.2.1 *Massa corporal e consumo de alimentos/água*

Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se a substância em estudo for administrada através da água de beber, deve também medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana. O consumo de água também poderá ser levado em conta em estudos dietéticos ou de administração forçada em que esse consumo se possa alterar.

1.5.2.2 *Hematologia e bioquímica clínica*

Devem colher-se amostras de sangue de um local designado e, caso aplicável, essas amostras deverão ser armazenadas em condições adequadas. No final do período de estudo, serão colhidas amostras logo antes de se abaterem os animais ou como parte do procedimento de abate.

No final do ensaio e no caso de terem sido colhidas amostras de sangue intercalares, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e medida do tempo/potencial de coagulação.

Devem também efectuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com amostras de sangue de todos os animais, colhidas imediatamente antes do respectivo abate ou no âmbito do mesmo (com excepção dos animais encontrados moribundos ou abatidos no decurso do ensaio). Tal como no caso de estudos hematológicos, poderá efectuar-se uma recolha de amostras intercalares para efeito de análises bioquímicas clínicas. Recomenda-se que os animais sejam jejuados desde a véspera da colheita de sangue ¹. Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, além de, pelo menos, dois enzimas indicadores dos efeitos hepatocelulares (tais como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase, a fosfatase alcalina, a gama-glutamil transpeptidase e a sorbitol-desidrogenase). A determinação de outras enzimas de origem hepática ou diversa, bem como de ácidos biliares, poderá, em determinados casos, proporcionar informações úteis.

Em opção, podem realizar-se na última semana do ensaio as seguintes determinações na urina, recolhida de acordo com um programa previamente estabelecido: aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glicose e sangue/hematócitos.

Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Caso as propriedades conhecidas da substância afectem, ou se preveja que possam afectar, perfis metabólicos conexos, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente de cálcio, fosfatos, triglicéridos em jejum, hormonas específicas, meta-hemoglobina e colinesterase. A necessidade de efectuar tais determinações é estabelecida em função do tipo de substância em estudo ou de cada caso específico.

De um modo geral, deve adoptar-se uma abordagem flexível, em função das espécies e dos efeitos observados e/ou previstos da substância em causa.

Se os dados disponíveis relativos a ensaios anteriores se revelarem inadequados, haverá que decidir sobre a necessidade de se determinarem parâmetros hematológicos e bioquímicos antes de administrar a substância. Dum modo geral, não se recomenda que estes dados sejam gerados antes de se iniciar a administração (7).

¹

Para a determinação de determinados parâmetros no soro e no plasma, nomeadamente a glicose, é preferível que os animais sejam jejuados desde a véspera, principalmente porque, não sendo jejuados, haverá inevitavelmente uma maior variabilidade que tenderá a encobrir os efeitos mais subtis e a tornar difícil a interpretação dos resultados. No entanto, por outro lado, o jejum desde a véspera poderá interferir no metabolismo geral dos animais, e, particularmente em estudos alimentares, poderá perturbar a exposição diária à substância em estudo. Se for adoptado o jejum desde a véspera, deverão efectuar-se determinações bioquímicas após a realização das observações funcionais do estudo.

1.5.2.3 *Autópsia geral*

Todos os animais devem ser objecto de uma autópsia geral pormenorizada que inclua o exame da superfície exterior do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal, bem como do respectivo conteúdo. Devem remover-se de modo adequado as membranas aderentes a órgãos tais como o fígado, os rins, as glândulas supra-renais, os testículos, os epidídimos, o timo, o baço, o cérebro e o coração, cuja massa húmida deve ser determinada logo que possível após a dissecação, de modo a evitar a respectiva dessecação. Este procedimento aplica-se a todos os animais (excepto os que estiverem moribundos ou tiverem sido abatidos no decurso do ensaio).

Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todos os tecidos que apresentem lesões evidentes, encéfalo (regiões representativas, nomeadamente cérebro, cerebelo e protuberância), espinal medula (a três níveis: cervical, médio-torácico e lombar), pituitária, tiróide, paratiróide, timo, esófago, glândulas salivares, estômago, intestino delgado e cólon (incluindo as placas de Peyer), fígado, rins, glândulas supra-renais, baço, coração, traqueia e pulmões (conservados por insuflação com fixador seguida de imersão), aorta, gónadas, útero, órgãos genitais acessórios, glândula mamária (nas fêmeas), próstata, bexiga, vesícula (ratinho), gânglios linfáticos (de preferência um gânglio situado na via de administração e um gânglio distante da mesma, de modo a investigar possíveis efeitos sistémicos), nervos periféricos (ciático ou tibial), de preferência na proximidade de músculos, e uma secção de medula óssea (ou, como alternativa, um aspirado de medula óssea recentemente montado), pele e olhos (se tiverem sido observadas alterações no exame oftalmológico). Em função das observações clínicas ou de natureza diversa efectuadas, poderá ser necessário examinar outros tecidos. Devem também conservar-se quaisquer órgãos susceptíveis de constituírem alvos da substância em estudo, em virtude das propriedades conhecidas da mesma.

1.5.2.4 *Histopatologia*

Deve proceder-se ao exame histopatológico dos órgãos e tecidos conservados dos animais dos grupos de controlo, bem como dos lotes sujeitos a doses elevadas. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes.

Devem examinar-se todas as lesões importantes.

Sempre que se recorra a um lote extra, deve proceder-se ao exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos restantes lotes.

2 **RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO**

2.1 **DADOS**

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou abatidos por uma questão de humanidade, a hora da morte de cada animal, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o tempo decorrido até à respectiva manifestação, bem como a sua duração e gravidade, o número de animais que apresentem lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões.

Caso aplicável, os resultados numéricos devem ser avaliados segundo um método estatístico adequado e geralmente aceite. Os métodos estatísticos e dados a serem analisados devem ser seleccionados durante a fase de concepção do estudo.

2.2 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1 **Substância em estudo:**

- natureza física, pureza e propriedades físico-químicas;
- dados de identificação;
- veículo (caso aplicável): justificação da escolha de um veículo não-aquoso.

2.2.2 **Espécie submetida ao ensaio:**

- espécie e estirpe utilizada;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- massa de cada animal no início do ensaio.

2.2.3 **Condições do ensaio**

- justificação das doses seleccionadas;
- pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à sua eventual incorporação nos alimentos, nomeadamente a respectiva concentração, estabilidade e homogeneidade;
- modo de administração da substância em estudo;
- doses reais (mg/kg massa corporal/dia), e factor de conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real, quando aplicável;
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

2.2.4 **Resultados:**

- massa corporal e respectivas alterações;
- consumo de alimentos e de água, se for caso disso;
- reacções tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente sinais de toxicidade;
- natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);
- resultados do exame oftalmológico;
- dados relativos à actividade sensorial, força de preensão e actividade motora (caso existam);
- resultados da análise hematológica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base;
- resultados da análise bioquímica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base;
- massa corporal final, massa dos órgãos e relações massas dos órgãos/massa corporal;
- dados obtidos por autópsia;
- descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico;
- dados de absorção, caso se encontrem disponíveis;
- tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

3. **BIBLIOGRAFIA**

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
- (3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
- (4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., 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.
- (5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxivol.*, 1, 233-236.
- (6) 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.
- (7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 29, 198-201.

B.27. ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA

ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ESPÉCIES NÃO ROEDORAS COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS

1. MÉTODO

O presente método de ensaio da toxicidade oral subcrónica é idêntico ao método OCDE TG 409 (1998).

1.1 INTRODUÇÃO

Ao avaliarem-se as características tóxicas de uma substância, poderá proceder-se à determinação da toxicidade oral subcrónica utilizando doses repetidas depois de se ter obtido informação inicial sobre a toxicidade em ensaios de toxicidade aguda ou de dose repetida com a duração de 28 dias. O estudo de 90 dias permite obter informação sobre os perigos para a saúde susceptíveis de decorrer de uma exposição repetida ao longo de um período de crescimento rápido e até ao início da vida adulta. O estudo permitirá obter informação sobre os principais efeitos tóxicos, identificar os órgãos-alvo e a possibilidade de acumulação, bem como fazer uma estimativa de um nível de exposição sem efeitos adversos observados a utilizar na selecção dos níveis de administração em estudos crónicos e na determinação de critérios de segurança para a exposição no caso de seres humanos.

O método de ensaio permite identificar, em espécies não-roedoras, os efeitos adversos da exposição a substâncias químicas e deve ser utilizado apenas:

- nos casos em que os efeitos observados noutros estudos revelem a necessidade de clarificação/caracterização numa segunda espécie não-roedora; ou
- nos casos em que estudos toxicocinéticos revelem que uma determinada espécie não-roedora é a escolha de animal laboratorial mais adequada; ou
- nos casos em que outras razões específicas justifiquem a utilização de uma espécie não-roedora.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2 DEFINIÇÕES

Dose: quantidade de substância administrada. A dose é expressa em termos de massa (g, mg) ou em termos da massa da substância de ensaio por massa unitária do animal estudado (por exemplo, mg/kg), ou em termos de concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem: termo geral que abrange a dose administrada, bem como a frequência e duração da administração.

NOAEL: abreviatura de "no observed adverse effect level" ("dose sem efeitos adversos observados"), que consiste na dose máxima ou no nível de exposição máximo que não produz efeitos adversos detectáveis no ensaio atribuíveis ao mesmo.

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada diariamente por via oral, em doses crescentes (uma dose por lote), a vários lotes de animais de ensaio, durante um período de 90 dias. No decurso deste período, os animais são examinados em pormenor, com vista à detecção de quaisquer sinais de toxicidade. Efectua-se a autópsia dos animais que morrem ou são sacrificados durante o ensaio e, no final do mesmo, procede-se ao abate dos sobreviventes e à respectiva autópsia.

1.4 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1 **Seleção das espécies animais**

A espécie não-roedora normalmente utilizada é o cão, que deve ser de uma raça específica; utiliza-se frequentemente o *beagle*. Poderão também utilizar-se outras espécies, como, por exemplo, suínos ou mini-suínos. Não se recomendam primatas, cuja utilização deve ser justificada. Devem utilizar-se animais jovens e saudáveis, e, no caso do cão, a administração deve iniciar-se de preferência aos 4-6 meses, e, o mais tardar, aos 9 meses de idade. No caso de o estudo preceder um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie/raça em ambos os casos.

1.4.2 **Preparação dos animais**

Devem ser utilizados animais saudáveis que tenham sido aclimatados às condições laboratoriais e não tenham sido anteriormente submetidos a processos experimentais. A duração da aclimação dependerá da espécie seleccionada para o ensaio e da sua proveniência. Recomenda-se uma aclimação de pelo menos 5 dias para os cães ou suínos especificamente criados para o efeito a partir de uma colónia residente, e pelo menos 2 semanas para suínos de proveniência externa. Os animais utilizados no estudo devem ser caracterizados quanto à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais devem ser repartidos aleatoriamente pelos grupos de ensaio e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação diferente.

1.4.3 **Preparação das doses**

A substância em estudo pode ser administrada através dos alimentos ou da água de beber, por sonda gástrica ou em cápsulas. O método de administração oral depende do objectivo do ensaio, bem como das propriedades físico-químicas da substância em estudo.

Se necessário, a substância é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se que se considere primeiramente a possibilidade de se utilizar uma solução ou suspensão aquosa; em segundo lugar, uma solução ou emulsão em óleo (nomeadamente óleo de milho); e, por último, uma solução noutra veículo. No caso de se utilizar um veículo não-aquoso, devem conhecer-se as respectivas características de toxicidade. Deve também determinar-se a estabilidade da substância nas condições de administração.

1.5 PROCEDIMENTOS

1.5.1 **Número e sexo dos animais**

Para cada dose, devem utilizar-se, pelo menos, 8 animais (4 machos e 4 fêmeas). Caso se preveja o sacrifício de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar. O número de animais no final do estudo deve ser suficiente para permitir uma avaliação válida dos efeitos tóxicos. Com base em conhecimentos anteriores da substância em estudo ou de um análogo próximo, deverá considerar-se a possibilidade de incluir um lote extra de 8 animais (quatro por sexo) no grupo de controlo e no grupo a que irá ser administrada a dose máxima, a fim de se observar, após o período de ensaio, a reversibilidade ou persistência de eventuais efeitos tóxicos. A duração deste período de observação deverá ser correctamente estabelecida tendo em conta os efeitos a observar.

1.5.2 **Dosagem**

Devem ser utilizadas pelo menos três doses e um controlo simultâneo, excepto nos casos em que seja realizado um ensaio-limite (ver 1.5.3). As doses poderão basear-se nos resultados de estudos de dose repetida ou de determinação da gama e deverão levar em conta todos os dados toxicológicos e toxicocinéticos existentes relativos ao composto em estudo ou a substâncias afins. A dose máxima deve ser seleccionada com a finalidade de provocar toxicidade, mas não a morte nem um sofrimento excessivo, a não ser que a natureza físico-química ou os efeitos biológicos da substância em estudo determinem que a referida dose seja limitada. Deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos adversos associados à administração da dose mínima (NOAEL). A diferença óptima entre as doses consiste, frequentemente, num factor de 2 a 4; em muitos casos, a utilização de um quarto lote de ensaio é preferível ao recurso a intervalos de grande amplitude (por exemplo, superior a um factor de 6-10) entre as doses.

O grupo de controlo deve ser constituído por animais aos quais não é administrada a substância em estudo ou um grupo de controlo do veículo se for utilizado um veículo para administrar a substância em estudo. Com excepção da exposição à substância em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser manuseados de forma idêntica aos outros animais. Caso se recorra a um veículo para a administração da substância em estudo, deve administrar-se o volume máximo do mesmo aos animais do lote de controlo. Se a substância em estudo for administrada através dos alimentos provocando um menor consumo alimentar, será vantajoso utilizar-se um grupo de controlo alimentados aos pares para se distinguir entre as reduções que se devem à palatabilidade e a alterações toxicológicas no modelo em estudo.

Deverão considerar-se as seguintes características do veículo e outros aditivos, conforme aplicável: efeitos ao nível da absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância em estudo; efeitos nas propriedades químicas da substância em estudo susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos ou água ou no estado nutricional dos animais.

1.5.3 **Ensaio-limite**

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1.000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se prevejam efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio completo com três doses. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5.4 **Administração das doses**

A substância é administrada diariamente aos animais durante um período de 90 dias; em casos devidamente justificados, pode proceder-se à administração cinco dias por semana. A administração forçada deve efectuar-se numa dose única, por intermédio de uma sonda gástrica ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode administrar-se de cada vez depende das dimensões do animal. Normalmente, deve administrar-se o mínimo volume possível. Salvo no caso de substâncias corrosivas ou irritantes, cujos efeitos são, de modo geral, agravados em concentrações mais elevadas, devem minimizar-se as variações no volume mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante para todas as doses.

Caso a substância em estudo seja administrada através dos alimentos ou da água de beber, deve assegurar-se que as respectivas quantidades não perturbam o equilíbrio nutricional e hídrico normal. Se a substância for administrada com os alimentos, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante, expressa em ppm, ou uma dose constante, expressa em relação à massa corporal dos animais; deve especificar-se a alternativa adoptada. No caso de uma substância administrada por meio de uma sonda gástrica ou cápsula, a dose deve ser administrada diariamente à mesma hora e, se necessário, ajustada de modo a manter uma dose constante em relação à massa corporal do animal. Caso um ensaio de 90 dias preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

1.5.5 **Observações**

O período de observação deve ser de, pelo menos, 90 dias. Os animais incluídos nos lotes extra destinados a observações subsequentes devem ser mantidos em observação durante um período de tempo suficiente sem administração da substância em estudo, de modo a detectar a persistência ou a recuperação dos efeitos tóxicos.

Deve efectuar-se um exame clínico pelo menos uma vez por dia, de preferência à mesma hora, em função do período previsto de efeitos mais agudos devidos à administração da substância, registando-se o estado de saúde dos animais. Todos os animais deverão ser examinados pelo menos duas vezes por dia, normalmente ao princípio e ao fim de cada dia, a fim de se identificarem sinais de morbilidade e mortalidade.

Deve proceder-se a um exame clínico aprofundado de todos os animais pelo menos uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir efectuar comparações com o mesmo indivíduo) e uma vez por semana após a mesma. Estas observações devem ser feitas, caso possível, fora da gaiola, num recinto adequado, e de preferência sempre às mesmas horas. Deve procurar-se assegurar que as variações nas condições de observação sejam mínimas. Os sinais de toxicidade devem ser cuidadosamente registados, incluindo a hora a que se manifestaram, a sua intensidade e duração. As observações devem incluir alterações na pele, no pêlo, nos olhos e nas mucosas, bem como a ocorrência de secreções, excreções ou actividade autónoma (como, por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, alterações nas pupilas, respiração anormal). Devem também registar-se quaisquer alterações da atitude, postura e reacção à manipulação, além da ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e comportamentos estereotipados (por exemplo, actos de higiene repetitivos, movimentos circulares repetitivos) ou estranhos.

Deve proceder-se a um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou equipamento equivalente adequado, antes de se iniciar a administração da substância em estudo e ao terminar o estudo, de preferência a todos os animais, mas pelo menos, aos animais dos grupos de dose máxima e de controlo. Se forem detectadas alterações nos olhos atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se todos os animais.

1.5.5.1 *Massa corporal e consumo de alimentos/água*

Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se a substância em estudo for administrada através da água de beber, deve também medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana. O consumo de água também poderá ser levado em conta em estudos dietéticos ou de administração forçada em que esse consumo se possa alterar.

1.5.5.2 *Hematologia e bioquímica clínica*

Devem colher-se amostras de sangue de um local designado e, caso aplicável, essas amostras deverão ser armazenadas em condições adequadas. No final do período de estudo, serão colhidas amostras mesmo antes de se abaterem os animais ou como parte do procedimento de abate.

No início do estudo e, posteriormente, a intervalos mensais ou a meio do período do estudo, e, por último, no final do estudo, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e medida do potencial de coagulação, como, por exemplo, tempo de coagulação, tempo de protrombina, ou tempo do tromboplastina.

Devem também efectuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com amostras de sangue de todos os animais, colhidas no início do estudo, em seguida mensalmente ou a meio do período do estudo, e, por último, no final do período do estudo. As áreas de ensaio que devem ser consideradas são o equilíbrio electrolítico, o metabolismo dos hidratos de carbono, e as funções hepática e renal. A selecção de ensaios específicos será feita com base em observações do modo de acção da substância em estudo. Recomenda-se que os animais sejam jejuados durante um período de tempo adequado para a respectiva espécie antes de se proceder à colheita de amostras de sangue. Sugere-se que sejam determinados os seguintes parâmetros: cálcio, fósforo, cloreto, sódio, potássio, glicose em jejum, alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, ornitina descarboxilase, gama-glutamyl-transpeptidase, nitrogénio ureico, albumina, creatinina no sangue, bilirrubina total e proteína sérica total.

Devem efectuar-se determinações na urina pelo menos no início, seguidamente a meio, e, por último, no final do estudo de acordo com um programa previamente estabelecido. As determinações a efectuar na urina devem incluir a aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glicose e sangue/hematócitos. Caso necessário, poderão utilizar-se outros parâmetros a fim de alargar o estudo de um ou mais efeitos observados.

Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Entre outras determinações que poderão ser necessárias para uma avaliação toxicológica adequada referem-se análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácidos/bases, meta-hemoglobina e inibição da colinesterase. Caso necessário, poderão efectuar-se outras determinações bioquímicas para alargar o estudo dos efeitos observados. A necessidade de efectuar tais determinações é estabelecida em função do tipo de substância em estudo ou de cada caso específico.

Dum modo geral, deve adoptar-se uma abordagem flexível, em função das espécies e dos efeitos observados e/ou previstos da substância em causa.

1.5.5.3

Autópsia geral

Todos os animais devem ser objecto de uma autópsia geral pormenorizada que inclua o exame da superfície exterior do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal, bem como do respectivo conteúdo. Devem remover-se de modo adequado as membranas aderentes a órgãos tais como o fígado (com a vesícula), os rins, as glândulas supra-renais, os testículos, os epidídimos, os ovários, o útero, a tiróide (com paratiróides), o timo, o baço, o cérebro e o coração, cuja massa húmida deve ser determinada logo que possível após a dissecação, de modo a evitar a respectiva dessecação. Este procedimento aplica-se a todos os animais (excepto os que estiverem moribundos ou tiverem sido abatidos no decurso do ensaio).

Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todos os tecidos que apresentem lesões evidentes, encéfalo (regiões representativas, nomeadamente cérebro, cerebelo e protuberância), espinal medula (a três níveis: cervical, médio-torácico e lombar), pituitária, olhos, tiróide, paratiróide, timo, esófago, glândulas salivares, estômago, intestino delgado e cólon (incluindo as placas de Peyer), fígado, vesícula, pâncreas, rins, glândulas supra-renais, baço, coração, timo, tiróide, traqueia e pulmões, aorta, gónadas, útero, órgãos genitais acessórios, glândula mamária feminina, bexiga, gânglios linfáticos (de preferência um gânglio situado na via de administração e um gânglio distante da mesma, de modo a investigar possíveis efeitos sistémicos), nervos periféricos (ciático ou tibial), de preferência na proximidade de músculos, e uma secção de medula óssea (ou, como alternativa, um aspirado de medula óssea recentemente montado) e pele. Em função das observações clínicas ou de natureza diversa efectuadas, poderá ser necessário examinar outros tecidos. Devem também conservar-se quaisquer órgãos susceptíveis de constituírem alvos da substância em estudo, em virtude das propriedades conhecidas da mesma.

1.5.5.4 *Histopatologia*

Deve proceder-se ao exame histopatológico dos órgãos e tecidos conservados dos animais dos grupos de controlo, bem como dos lotes sujeitos a doses elevadas. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes.

Devem examinar-se todas as lesões importantes.

Sempre que se recorra a um lote extra, deve proceder-se ao exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos restantes lotes.

2. **RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO**

2.1 DADOS

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou abatidos por uma questão de humanidade, a hora da morte de cada animal, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o tempo decorrido até à respectiva manifestação, bem como a sua duração e gravidade, o número de animais que apresentem lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões.

Caso aplicável, os resultados numéricos devem ser avaliados segundo um método estatístico adequado e geralmente aceite. Os métodos estatísticos e dados a serem analisados devem ser seleccionados durante a fase de concepção do estudo.

2.2 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1 **Substância em estudo:**

- natureza física, pureza e propriedades físico-químicas;
- dados de identificação;
- veículo (caso aplicável): justificação da escolha de um veículo não-aquoso.

2.2.2 **Espécie submetida ao ensaio:**

- espécie e a estirpe utilizada;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- massa de cada animal no início do ensaio.

2.2.3 **Condições do ensaio**

- justificação para a selecção das doses;
- pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à sua eventual incorporação nos alimentos, nomeadamente a respectiva concentração, estabilidade e homogeneidade;
- modo de administração da substância em estudo;
- doses reais (mg/kg massa corporal/dia), e factor de conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real, quando aplicável;
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

2.2.4

Resultados:

- massa corporal e respectivas alterações;
- consumo de alimentos e de água, se for caso disso;
- reacções tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente sinais de toxicidade;
- natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);
- exame oftalmológico;
- resultados da análise hematológica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base;
- resultados da análise bioquímica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base;
- massa corporal final, massa dos órgãos e relações massas dos órgãos/massa corporal;
- dados obtidos por autópsia;
- descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico;
- dados de absorção, caso se encontrem disponíveis;
- eventual tratamento estatístico dos resultados.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

B. 28

TOXICIDADE DÉRMICA SUBCRÓNICA:

TESTE DE NOVENTA DIAS EM ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

A substância a testar é aplicada diariamente em doses graduais na pele dos animais dos vários grupos, à razão de uma dose por grupo por um período de noventa dias. Durante o período de aplicação, os animais são observados diariamente para se detectarem manifestações de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados e no fim da experiência os animais sobreviventes são igualmente autopsiados.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência, durante pelo menos cinco dias antes do teste. Antes de começar o teste os animais jovens e saos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

Pouco tempo antes de se iniciar o ensaio rapam-se os pêlos da região dorsal dos animais. Se se recorrer à tosquia esta deverá ser efectuada mais ou menos 24 horas antes do teste. Normalmente é necessário repetir estas operações todas as semanas devendo tomar-se muito cuidado para não lesar a pele.

A área destinada à aplicação da substância a testar não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. O peso do animal entrará em linha de conta na decisão da zona a expôr e da dimensão da superfície a tratar. Sempre que se testam substâncias sólidas, que se necessário podem ser pulverizadas, a substância a testar deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. As substâncias a testar líquidas são geralmente usadas sem ser diluídas. Procede-se a uma aplicação diária durante cinco a sete dias por semana.

Condições experimentais

Animais de experiência

Podem ser utilizados o rato, o coelho ou a cobaia; também podem usar-se outras espécies sendo necessário justificar o seu emprego. No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar $\pm 20\%$ do peso médio. Se um estudo dérmico subcrónico constituir a fase preliminar de um estudo a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

Para cada dose serão utilizados pelo menos vinte animais (dez fêmeas e dez machos) de pele sã. As fêmeas deverão ser nulas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência devem acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê ir sacrificar. Para além destes poderá haver um grupo satélite de vinte animais (dez de cada sexo) tratado com a dose mais elevada, durante noventa dias e observado quanto à reversibilidade, à persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante vinte e oito dias após o tratamento.

Doses

São necessárias pelo menos três doses diferentes com um controlo ou um veículo de controlo se for usado um veículo. O período de exposição deverá no mínimo ser de seis horas por dia. A substância a testar será aplicada diariamente à mesma hora e a quantidade a administrar será ajustada regularmente (semanalmente ou bissemanalmente), de modo a manter-se constante relativamente ao peso corporal do animal. Os animais do grupo de controlo serão tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de experiência com excepção da aplicação da substância a testar. Se se utilizar um veículo para facilitar a administração, este será administrado ao grupo de controlo da mesma forma que aos grupos tratados, devendo a dose corresponder à do grupo tratado com a dose mais elevada. A dose mais elevada será determinada de forma a produzir efeitos tóxicos mas nunca, ou raramente, a morte do animal; a dose mais baixa não deverá produzir quaisquer efeitos tóxicos. Se se dispuser de informação sobre a exposição humana, a dose mais baixa deverá exceder esse valor. O ideal seria a dose intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observável.

Se se utilizarem várias doses intermédias a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos grupos das doses mais baixa e intermédia a incidência de mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

Se a aplicação da substância a testar provocar uma grave irritação cutânea, deverão reduzir-se as concentrações, o que poderá originar uma diminuição ou até um desaparecimento dos outros efeitos tóxicos da dose mais elevada. Se as lesões cutâneas forem muito graves, pode tornar-se necessário interromper a experiência e recomencá-la com concentrações mais fracas.

Teste limite

Se já tiver sido efectuada uma experiência preliminar com uma dose de 1 000 mg/kg ou com uma dose mais elevada em função da possibilidade de uma exposição humana conhecida, que não tenha provocado quaisquer efeitos tóxicos, será inútil prosseguir a experiência.

Período de observação

Os animais da experiência serão observados diariamente para detectar manifestações de toxicidade. Serão registados o momento da morte e o momento do aparecimento e desaparecimento das manifestações de toxicidade.

Procedimento

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. Em condições ideais a substância a testar será administrada aos animais sete dias por semana durante um período de noventa dias.

Os animais de todos os grupos satélites que forem objecto de observações complementares serão mantidos vivos durante mais vinte e oito dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos. O tempo de exposição será de seis horas por dia.

A substância a testar será aplicada uniformemente numa área equivalente a 10 % da superfície total do corpo. No caso de substâncias altamente tóxicas, a superfície a utilizar poderá ser menor mas a camada da substância deverá ser o mais fina e uniforme possível.

Durante a exposição a substância a testar é mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo anti-alérgico. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância a testar, e a evitar que os animais ingiram a dita substância. Podem utilizar-se aparelhos de contenção, para evitar a ingestão da substância, mas não se recomenda a imobilização completa.

No fim do tempo de exposição, se possível, é necessário eliminar todos os resíduos da substância com água ou por meio de qualquer outro método adequado de limpeza da pele.

Os animais serão observados diariamente, sendo sempre registadas as manifestações de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e duração. Durante o período de cativeiro observar-se-ão as modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central assim como da actividade somatomotora e do comportamento. O consumo alimentar e o peso dos animais serão determinados semanalmente.

Devem observar-se regularmente os animais a fim de se evitarem perdas por canibalismo, por autólise dos tecidos ou por condições impróprias de alojamento. No fim da experiência todos os animais sobreviventes dos grupos tratados não satélites serão autopsiados. Os animais moribundos serão imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames que a seguir se enunciam são normalmente feitos a todos os animais incluindo os controlos:

- a) Um exame oftalmológico usando um oftalmoscópio ou equipamento adequado equivalente deve ser feito antes da administração da substância a testar e no fim da experiência, de preferência a todos os animais, ou pelo menos nos grupos da dose mais elevada e de controlo. Se se detectarem alterações oculares devem examinar-se todos os animais;

- b) Um exame hematológico será efectuado no fim da experiência compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária bem como um estudo da coagulação e tempo de coagulação, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, ou contagem de plaquetas;
- c) A determinação de dados bioquímicos no sangue deve ser feita no fim da experiência. Apresentam um interesse geral para todos os estudos a avaliação do equilíbrio electrolítico, do metabolismo dos hidratos de carbono, da função hepática e renal. A escolha dos testes específicos será influenciada por observações relativas ao modo de acção da substância a testar. Sugere-se o doseamento do cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum (o período de jejum dependerá da espécie), transaminase glutâmico-pirúvica séria⁽¹⁾, transaminase glutâmico-oxaloacética séria⁽²⁾, ornitina-descarboxilase, gama-glutamil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirubina total e as proteínas séricas totais. As outras análises eventualmente necessárias a uma avaliação toxicológica adequada incluem análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, methemoglobina, e actividade colinesterásica. Podem efectuar-se outras análises bioquímicas clínicas, se necessário, para aprofundar o estudo dos efeitos observados;
- d) Um exame regular da urina não é necessário; este exame só é indicado em caso de efeitos tóxicos prováveis ou manifestos.

Se a informação de estudos anteriores não for apropriada deverá considerar-se a necessidade de determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos clínicos antes de começar a experiência.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral que incluirá o exame da superfície exterior do corpo, de todos os orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal e respectivos conteúdos. O fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos serão pesados, ainda húmidos, o mais rapidamente possível depois da dissecação, para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Os seguintes órgãos e tecidos deverão ser conservados num meio adequado na eventualidade de um exame histopatológico ulterior: todas as lesões macroscópicas, encéfalo incluindo cortes da medula/protuberância, córtex cerebeloso e córtex cerebral, hipófise, tiróideia, paratiróideia, todo o tecido tímico, (traqueia), pulmões, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins, supra-renais, pâncreas, gónadas, útero, órgãos genitais anexos, vesícula biliar (quando presente), esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo, (glândula mamária na fêmea), (musculatura da coxa), nervo periférico, (olhos), (esternão com medula óssea), (fémur, incluindo superfície articular), (medula espinhal a três níveis — cervical, mediotorácica e lombar) e (glândulas lacrimais). Os tecidos mencionados entre parênteses só serão examinados em caso de aparecimento de sinais de toxicidade ou de compromisso do órgão alvo.

Exame histopatológico

- a) Serão objecto de um exame histopatológico completo a pele normal e a pele tratada assim como os órgãos e tecidos de todos os animais de controlo e do grupo exposto à dose mais elevada;
- b) Todas as lesões macroscópicas serão examinadas;
- c) Os órgãos alvo dos animais pertencentes aos grupos tratados com outras doses deverão ser examinados;
- d) Se se utilizarem ratos, os pulmões dos animais dos grupos expostos às doses baixa e intermédia serão submetidos a um exame histopatológico para se detectar qualquer sinal de infecção uma vez que isso nos permite uma avaliação conveniente do estado de saúde dos animais. Outros exames histopatológicos sistemáticos podem não se justificar para os animais desses grupos mas devem ser sempre efectuados aos órgãos que apresentem lesões no grupo tratado com a dose mais elevada;
- e) Quando se usar um grupo satélite, será feito um exame histopatológico aos tecidos e órgãos que apresentem sinais de toxicidade nos grupos tratados.

2. RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos sob a forma de quadros, indicando, para cada grupo de experiência, o número de animais no início desta, o número de animais apresentando lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais apresentando cada tipo de lesão. O resultados serão avaliados por meio dum método estatístico apropriado. Pode utilizar-se qualquer método estatístico reconhecido.

⁽¹⁾ Conhecida actualmente por transaminase da alanina.
⁽²⁾ Conhecida actualmente por transaminase do aspartato.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

- espécie, estirpe, origem, condições do meio ambiente, dieta,
- doses (compreendendo veículo, se utilizado) e concentrações,
- resposta tóxica por sexo e por dose,
- dose sem efeitos, se possível,
- momento de morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,
- descrição dos efeitos tóxicos ou outros,
- momento da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,
- dados relativos à alimentação e peso do animal,
- observações oftalmológicas,
- exames hematológicos efectuados e seus resultados,
- testes bioquímicos clínicos utilizados e seus resultados (incluindo resultados das análises de urina),
- resultados da autópsia,
- descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,
- tratamento estatístico dos resultados, se possível,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados,
- condições experimentais.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 29
TOXICIDADE SUBCRÓNICA POR INALAÇÃO:

TESTE DE NOVENTA DIAS EM ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Vários grupos de animais de experiência são expostos diariamente, por um período determinado, a concentrações diferentes de substâncias a testar à razão de uma concentração por grupo durante um período de noventa dias. Quando se utiliza um veículo para ajudar a obter uma concentração apropriada da substância a testar na atmosfera deve usar-se um grupo controlo para o veículo. Durante o período de administração os animais são observados diariamente para se detectarem as manifestações de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados e no fim da experiência os animais sobreviventes são igualmente autopsiados.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Discrição do método de ensaio

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do teste. Antes de começar o teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo. Se necessário pode adicionar-se um veículo à substância a testar para se conseguir uma concentração apropriada desta na atmosfera; se um veículo ou outros aditivos forem usados para facilitar a administração devem ser comprovadamente não tóxicos. Pode recorrer-se a dados anteriormente publicados se necessário.

Condições experimentais

Animais de experiência

Salvo contra-indicação a espécie preferida é o rato. Devem utilizar-se animais jovens e sãos de uma estirpe corrente de laboratório. No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar $\pm 20\%$ do peso médio. Se um estudo subcrónico por inalação constituir a fase preliminar de um estudo a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

Para cada concentração de exposição serão utilizados pelo menos vinte animais (dez fêmeas e dez machos). As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência devem acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê ir sacrificar. Para além destes um grupo satélite de vinte animais (dez de cada sexo) poderá ser exposto à concentração mais elevada durante noventa dias e ser observado quanto à reversibilidade, à persistência ou ao aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante vinte e oito dias após o tratamento.

Concentração de exposição

São utilizadas pelo menos três concentrações, com um grupo controlo ou, se necessário, um grupo controlo para o veículo quando este for utilizado (correspondendo a concentração do veículo ao nível de exposição mais elevada).

Os animais do grupo de controlo são tratados da mesma forma que os dos grupos da experiência com excepção da inalação da substância a testar. A concentração mais elevada deverá produzir efeitos tóxicos mas nenhuma ou poucas mortes.

Se se dispuser de informação sobre a exposição humana a concentração mais baixa será superior a esse valor. O ideal seria a concentração intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observável. Se se utilizarem várias concentrações intermédias a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos grupos de concentração baixa e intermédia assim como nos grupos controlo, a incidência de mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

Tempo de exposição

A duração diária do tempo de exposição deverá ser de seis horas após se obterem as concentrações dentro da câmara de exposição. Podem utilizar-se outros tempos de exposição para satisfazer outras exigências específicas.

Equipamento

Os animais serão expostos à substância a testar por meio de um dispositivo de inalação concebido de forma a conseguir-se um fluxo de ar contínuo que assegurará pelo menos doze renovações de ar por hora e garanta uma concentração de oxigénio apropriada e uma distribuição uniforme do produto a testar no ar. Se se utilizar uma câmara esta será concebida de maneira a obter-se uma superlotação mínima dos animais e uma exposição máxima à substância a testar.

Como regra geral para se assegurar a estabilidade da atmosfera na câmara o volume total dos animais de experiência não deve ultrapassar 5% do volume da câmara de ensaio. Pode também recorrer-se a um sistema de exposição oro-nasal, de cabeça apenas ou do corpo inteiro em câmara individual; os dois primeiros tipos de exposição permitem reduzir a penetração por outras vias.

Período de observação

Os animais da experiência deverão ser observados diariamente para se detectarem manifestações de toxicidade durante todo o período de exposição e de recuperação. Serão registados o momento da morte assim como o do aparecimento e desaparecimento das manifestações de toxicidade.

Procedimento

Os animais são expostos diariamente à substância a testar à razão de cinco a sete dias por semana, durante um período de noventa dias. Os animais dos grupos satélites destinados às observações complementares serão mantidos vivos durante mais vinte e oito dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos. A temperatura a que se efectua o teste deverá ser mantida a 22 ± 3 °C. Em condições óptimas, a humidade relativa deverá ser mantida entre 30 e 70% mas, nalguns casos, isto pode ser impraticável (por exemplo, testes com aerosol). Durante a exposição, os animais não receberão alimentos nem água. Deverá ser usado um sistema de inalação dinâmico com um dispositivo apropriado de controlo analítico da concentração. Recomenda-se a realização de um teste preliminar para se determinarem as concentrações apropriadas de exposição. O débito de ar deverá assegurar concentrações homogéneas em toda a câmara de exposição. O sistema deverá permitir a obtenção de condições estáveis o mais rapidamente possível.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

- a) Débito de ar (permanentemente);
- b) A concentração real da substância a testar medida na zona de respiração. Durante o período de exposição diária a concentração não variará além de $\pm 15\%$ do valor médio. Contudo no caso de poeiras e aerossóis esta precisão pode não ser possível e uma variação maior poderá então ser aceitável. Durante toda a duração da experiência, as concentrações diárias serão mantidas o mais constantes possível. Durante a elaboração do sistema gerador proceder-se-á a uma análise granulométrica das partículas para determinar a estabilidade das concentrações do aerosol. Durante a exposição far-se-ão análises o mais frequentemente possível para determinação da estabilidade da repartição granulométrica;
- c) Temperatura e humidade;
- d) Durante e após a exposição às concentrações são feitas observações e registadas sistematicamente; são feitas fichas individuais para cada animal. Todos os animais serão observados diariamente e as manifestações de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e a sua duração serão registados;

Durante o período de cativeiro é conveniente observar nomeadamente, as modificações da pele e do pêlo, dos olhos, das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, da actividade somatomotora e do comportamento. O consumo alimentar e o peso dos animais serão determinados todas as semanas. É necessário observar regularmente os animais a fim de se assegurar que não há perdas por canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. No fim da experiência, todos os animais sobreviventes são autopsiados. Durante a experiência, os animais moribundos serão imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames que a seguir se enunciam são normalmente feitos a todos os animais, incluindo os de controlo:

- a) Um exame oftalmológico usando um oftalmoscópio ou equipamento adequado equivalente deve ser feito antes da exposição à substância a testar e no fim da experiência de preferência a todos os animais ou pelo menos nos grupos da dose mais elevada e de controlo. Se se detectarem alterações oculares devem examinar-se todos os animais;
- b) Um exame hematológico será efectuado no fim da experiência compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária, bem como um estudo da coagulação pelo tempo de coagulação, tempo de protombina, tempo de trombolastina ou contagem de plaquetas;
- c) A determinação de dados bioquímicos no sangue deve ser feita no fim da experiência. Apresentam um interesse geral para todos os estudos a avaliação do equilíbrio electrolítico, do metabolismo dos hidratos de carbono, da função hepática e renal. A escolha dos testes específicos será influenciada por observações relativas ao modo de acção da substância a testar. Sugere-se o doseamento do cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum (o período de jejum dependerá da espécie), transaminase glutâmico-pirúvica séria ⁽¹⁾, transaminase glutâmico-oxaloacética séria ⁽²⁾, ornitina-descarboxilase, gama-glutamil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirubina total e as proteínas séricas totais. As outras análises eventualmente necessárias a uma avaliação toxicológica adequada incluem análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, methemoglobina e actividade colinesterásica. Podem efectuar-se outras análises bioquímicas clínicas, se necessário, para aprofundar o estudo dos efeitos observados;
- d) Um exame regular da urina não é necessário; este exame só é indicado em caso de efeitos tóxicos prováveis ou manifestos.

Se a informação de estudos anteriores não for apropriada deverá considerar-se a necessidade de determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos clínicos antes de começar a experiência.

Autópsia

Todos os animais são submetidos a uma autópsia geral que incluirá o exame da superfície exterior do corpo, de todos os orifícios e das cavidades cranianas, torácicas e abdominal e respectivos conteúdos. O fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos serão pesados, ainda húmidos, o mais rapidamente possível depois da dissecação para evitar a perda de líquidos por evaporação. Os seguintes órgãos e tecidos deverão ser conservados num meio adequado na eventualidade de exames histopatológicos ulteriores: todas as lesões macroscópicas, pulmões — que devem ser retirados inteiros, pesados e tratados com um fixador apropriado que permita conservar a estrutura pulmonar (considera-se a perfusão com o fixador como um método eficaz), tecidos da naso-faringe, encéfalo — incluindo cortes da medula/da protuberância, córtex cerebeloso e córtex cerebral, hipófise, tiróideia/paratiróideia, todo o tecido tímico, traqueia, pulmões, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins glândulas supra-renais, pâncreas, gónadas, útero, (órgãos genitais anexos), (pele), vesícula biliar (quando presente), esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo (glândula mamária na fêmea), (musculatura da coxa), nervo periférico, (olhos), esterno com medula óssea, (fémur, incluindo superfície articular), (medula espinhal a três níveis — cervical, mediotorácica e lombar). Os tecidos mencionados entre parentesis só serão observados em caso de aparecimento de sinais de toxicidade ou de compromisso do órgão alvo.

Exame histopatológico

- a) Serão objecto de um exame histopatológico completo as vias respiratórias, assim como os órgãos e tecidos de todos os animais do grupo de controlo e dos do grupo exposto à dose mais elevada;
- b) Todas as lesões macroscópicas serão examinadas;
- c) Os órgãos alvo dos animais pertencentes a outros grupos tratados serão examinados;
- d) Os pulmões dos animais pertencentes aos grupos expostos às doses baixa e intermédia serão submetidos a um exame histopatológico, uma vez que isto nos permite uma avaliação conveniente do estado de saúde dos animais. Outros exames histopatológicos sistemáticos podem não se justificar para os animais desses grupos mas devem ser sempre efectuados aos órgãos que apresentem lesões no grupo tratado com a dose mais elevada;
- e) Quando se usa um grupo satélite, será praticado um exame histopatológico aos tecidos e órgãos que apresentem sinais de toxicidade nos grupos tratados.

⁽¹⁾ Conhecida actualmente por transaminase da alanina.

⁽²⁾ Conhecida actualmente por transaminase do aspartato.

2. RESULTADOS

Os resultados serão resumidos sob a forma de quadros indicando, para cada grupo de teste o número de animais no início, o número de animais atingidos por lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais apresentando cada tipo de lesão. O resultados serão avaliados com um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. *Relatório do teste*

O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

- espécie, estirpe, origem, condições do meio ambiente, dieta,
- condições experimentais:

Descrição do aparelho de exposição: incluindo concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e de aerossóis, método de condicionamento de ar, tratamento do ar evacuado e, no caso disso, o método de acondicionamento dos animais na câmara de ensaio. O equipamento utilizado para medir a temperatura, a humidade, e se necessário, a estabilidade das concentrações do aerossol ou da granulometria das partículas será descrito.

Dados relativos à exposição: Estes dados serão apresentados sob a forma de um quadro indicando os valores médios assim como uma medida de variação (por exemplo: desvio-padrão) e dirão respeito:

- a) Aos débitos de ar através do dispositivo de inalação;
 - b) À temperatura e à humidade do ar;
 - c) Às concentrações nominais (quantidade total da substância a testar introduzida no dispositivo de inalação dividida pelo volume de ar);
 - d) À natureza do veículo se utilizado;
 - e) Às concentrações reais na zona de respiração;
 - f) Às dimensões médias das partículas, se necessário,
- resposta tóxica por seco e por concentração,
 - dose sem efeito, se possível,
 - momento da morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes,
 - descrição dos efeitos tóxicos ou outros,
 - momento de observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,
 - dados relativos à alimentação e peso corporal,
 - observações oftalmológicas,
 - exames hematológicos efectuados e seus resultados,
 - testes bioquímicos clínicos utilizados e seus resultados (incluindo análises de urina),
 - resultados da autópsia,
 - descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,
 - tratamento estatístico dos resultados, se apropriado,
 - discussão dos resultados,
 - interpretação dos resultados.

3.2. *Avaliação e interpretação*

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 30
TESTE DE TOXICIDADE CRÓNICA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

A substância a testar é administrada normalmente sete dias por semana, pela via apropriada a vários grupos de animais de experiência à razão de uma dose por cada grupo durante a maior parte da sua vida. Durante e depois da exposição à substância a testar observam-se diariamente os animais de experiência para se detectar manifestações de toxicidade.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência, durante pelos menos cinco dias antes do teste. Antes de começar o teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

Condições experimentais

Animais de experiência

A espécie preferida é o rato. Podem utilizar-se outras espécies (roedores ou não roedores) de acordo com os resultados de estudos anteriores. Devem utilizar-se animais jovens e sãos de estirpes correntes de laboratório, e o tratamento deve começar o mais cedo possível após o desmame.

No início da experiência a diferença de peso entre os animais não deverá ultrapassar $\pm 20\%$ do peso médio. Se um estudo subcrónico oral tiver constituído a fase preliminar de um estudo a longo prazo deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

No caso de roedores serão utilizados pelo menos quarenta animais (vinte fêmeas e vinte machos) para cada dose e grupo de controlo correspondente. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se estiver previsto o sacrifício de animais no decurso da experiência, os efectivos devem ser aumentados do número de animais cujo sacrifício estiver previsto. Para os não roedores aceita-se um número mais pequeno de animais, pelo menos quatro por sexo e por grupo.

Doses e frequência de exposição

Devem utilizar-se pelo menos três doses além do grupo de controlo correspondente. A dose máxima deverá produzir manifestações nítidas de toxicidade sem causar mortalidade excessiva. A dose mais baixa não produzirá nenhum efeito tóxico.

A(s) dose(s) intermédia(s) terá (terão) um valor próximo da média entre a dose máxima e a dose mínima.

Os níveis de dose deverão ter em conta os dados obtidos nos ensaios e estudos de toxicidade efectuados anteriormente.

Normalmente a frequência de exposição será diária. Se o produto químico for administrado na água de beber ou incorporado na alimentação deve estar constantemente disponível.

Controlos

Deverá utilizar-se um grupo de controlo idêntico em todos os aspectos aos grupos tratados com excepção da exposição à substância a testar.

Em condições especiais como em estudos por inalação implicando o emprego de aerossóis ou o uso de um emulsionante com actividade biológica não estudada em ensaios por via oral, deverá utilizar-se um grupo suplementar de controlo negativo correspondente. O grupo de controlo negativo é tratado da mesma maneira que os outros grupos com excepção da exposição à substância a testar ou a qualquer veículo.

Via de administração

As duas vias principais de administração são a oral e a respiratória (por inalação). A escolha da via de administração depende das características físico-químicas da substância a testar e da via mais provável de exposição humana.

A utilização da via cutânea coloca problemas práticos consideráveis. A toxicidade crónica sistémica provocada pela absorção percutânea pode normalmente deduzir-se dos resultados de outros testes orais, e do conhecimento da quantidade de substância absorvida por via percutânea em estudos anteriores de toxicidade por essa via.

Estudos por via oral

A via oral de administração é preferida, salvo contra-indicações, se a substância a testar for absorvida pelo tubo digestivo e se a ingestão for uma via possível de exposição humana.

Os animais podem receber a substância a testar na alimentação, dissolvida na água de beber, ou numa cápsula. Em condições ideais a dose diária será administrada sete dias por semana visto que a administração em cinco dias por cada sete pode permitir a recuperação do animal ou a diminuição de toxicidade no período em que o tratamento é interrompido e assim afectar os resultados e a avaliação subsequente. No entanto, por razões essencialmente práticas, a administração em cinco dias por cada sete é considerada aceitável.

Estudos por inalação

Um vez que os estudos por inalação colocam problemas técnicos de maior complexidade do que os por outras vias de administração, são dadas aqui recomendações mais pormenorizadas. Deve notar-se que a instilação endotraqueal pode constituir uma alternativa válida em certas situações específicas.

As exposições prolongadas (de longo prazo) são habitualmente calculadas em função da exposição humana prevista: os animais são expostos cinco dias por semana (exposição intermitente) à razão de seis horas por dia depois de se obterem as concentrações na câmara de experiência ou expostos sete dias em cada sete (exposição contínua) à razão de 22 a 24 horas por dia destinando-se uma hora por dia à alimentação dos animais segundo um horário regular e à manutenção das câmaras. Em ambos os casos os animais são habitualmente expostos a uma concentração fixa da substância a testar.

Uma diferença essencial entre a exposição intermitente e a exposição contínua reside no facto de na primeira os animais disporem dum período de 17 a 18 horas para recuperar dos efeitos da exposição diária e mesmo de um período mais longo durante os fins-de-semana. A escolha da exposição intermitente ou contínua será feita em função dos objectivos do estudo e da exposição humana que deve ser simulada. Convém no entanto ter em conta certas dificuldades técnicas: por exemplo as vantagens da exposição contínua na simulação das condições do ambiente podem ser contrariadas pela necessidade de alimentar e dar de beber aos animais durante a exposição e ainda pela necessidade de técnicas mais complicadas de produção de aerossóis e de vapores bem como de monitorização.

Câmaras de exposição

Os animais são expostos à substância a testar em câmaras de inalação concebidas de forma a conseguir-se um fluxo de ar dinâmico de pelo menos doze renovações de ar por hora e uma concentração adequada de oxigénio e uma distribuição uniforme da substância a testar no ar. As câmaras de exposição e as câmaras de controlo serão idênticas quanto à construção e concepção a fim de garantirem condições de exposição comparáveis em todos os aspectos, com excepção da exposição à substância a testar. Geralmente mantém-se uma ligeira pressão negativa no interior da câmara para impedir fugas da substância a testar para a área envolvente. As câmaras deverão ser concebidas de forma a evitar a superlotação com os animais de experiência.

Em geral para assegurar a estabilidade da atmosfera da câmara, o volume total dos animais de experiência não deve ultrapassar 5% do volume da câmara de exposição.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

- i) Débito do ar: o débito do ar na câmara deverá de preferência ser monitorizado continuamente;
- ii) Concentração: durante o período de exposição diária a concentração da substância a testar não deve variar mais que $\pm 15\%$ em redor do valor médio;
- iii) Temperatura e humidade: para roedores a temperatura deve ser mantida a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a humidade dentro da câmara será de 30 a 70% excepto quando se utilizar água para colocar em suspensão na atmosfera das câmaras a substância a testar. Estes parâmetros serão, de preferência, monitorizados permanentemente;
- iv) Análise granulométrica das partículas: deverá efectuar-se uma determinação da distribuição granulométrica das partículas nas atmosferas das câmaras onde se utilizam aerossóis líquidos ou sólidos. As partículas do aerosol deverão ter um diâmetro respirável para o animal de experiência utilizado. Serão retiradas amostras das atmosferas das câmaras de ensaio, na zona de respiração dos animais. A amostra de ar retirada deverá ser representativa da distribuição das partículas a que os animais são expostos e representará, numa base gravimétrica, o conjunto do aerosol em suspensão, mesmo se uma grande parte deste não for inalável. As análises granulométricas serão feitas frequentemente durante a elaboração do sistema gerador para assegurar a estabilidade do aerosol, sendo depois feitas tantas vezes quanto as necessárias durante as exposições para determinar de forma adequada a estabilidade das distribuições das partículas a que os animais forem expostos.

Duração do estudo

O período de administração deverá ser pelo menos de doze meses.

Procedimento

Observações

Deverá proceder-se pelo menos uma vez por dia a um exame clínico atento. Observações complementares deverão ser feitas diariamente e tomar-se medidas apropriadas para diminuir a perda de animais do estudo, por exemplo autópsia, ou refrigeração dos animais encontrados mortos e isolamento ou sacrifício dos animais de saúde precária. Os animais serão observados cuidadosamente para se detectar o aparecimento ou desaparecimento de sinais de toxicidade assim como para reduzir a perda de animais por doença, autólise dos tecidos ou canibalismo.

Os sinais clínicos incluindo as modificações neurológicas e oculares assim como a mortalidade serão registados relativamente a todos os animais. Será registado o momento do aparecimento de efeitos tóxicos e a sua evolução assim como os tumores suspeitos.

O peso de cada animal será determinado e registado uma vez por semana durante as teze primeiras semanas do período de ensaio e posteriormente pelo menos uma vez de quatro em quatro semanas. O consumo alimentar será determinado todas as semanas durante as treze primeiras semanas do estudo e posteriormente de três em três meses a menos que o estado de saúde ou as modificações do peso corporal dos animais justifiquem outra frequência.

Exame hematológico

Deverá efectuar-se um exame hematológico (por exemplo: concentração de hemoglobina, hematócrito, número total de leucócitos, plaquetas ou outros testes de coagulação) aos três meses, aos seis meses e em seguida a intervalos de seis meses e no fim da experiência, em amostras de sangue recolhidas de todos os não roedores e de dez ratos/sexo de cada grupo. Se possível as amostras deveriam ser colhidas de cada vez nos mesmos ratos. Além disso, deve colher-se uma amostra de sangue antes do teste, aos não roedores.

Se as observações clínicas sugerirem uma deterioração do estado de saúde de alguns dos animais durante o estudo, deverá obter-se uma fórmula leucocitária dos animais afectados. Deverá obter-se uma fórmula leucocitária em amostras de sangue dos animais do grupo tratado com a dose mais elevada e dos controlos. Serão obtidas fórmulas no(s) grupo(s) tratados com dose mais baixa apenas no caso de se verificar uma grande discrepância entre o grupo tratado com a dose mais elevada e os controlos, ou se indicados pelos achados patológicos.

Análise de urina

Serão colhidas as amostras de urina para análise a todos os não roedores assim como em dez ratos/sexo de todos os grupos, se possível sempre aos mesmos ratos e na mesma altura dos exames histopatológicos. Deverão ser efectuadas as seguintes determinações em cada animal individualmente ou, no caso dos roedores, num *pool* de urina do mesmo grupo e do mesmo sexo:

— aspecto: volume e densidade para os animais tomados individualmente,

- proteínas, glicose, corpos cetónicos, sangue oculto (semi-quantitativamente),
- microscopia do sedimento urinário (semi-quantitativamente).

Bioquímica clínica

De seis em seis meses e no fim do estudo colher-se-ão amostras de sangue para determinações bioquímicas clínicas de todos os não roedores e a dez ratos/sexo de todos os grupos, e se possível, sempre dos mesmos ratos de cada vez. Além disso, será recolhida uma amostra pré-teste dos não roedores. O plasma preparado a partir destas amostras será utilizado para as seguintes determinações:

- concentração de proteínas totais,
- concentração de albumina,
- testes de função hepática (tais como a actividade da fosfatase alcalina, actividades da transaminase glutâmico — pirúvica ⁽¹⁾ e da glutâmico-oxaloacética ⁽²⁾, gama-glutamil transpeptidase, ornitina descarboxilase,
- metabolismo dos hidratos de carbono como uma glicémia em jejum,
- testes da função renal como a ureia sanguínea.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral, incluindo os que morrem no decurso da experiência ou que tenham sido sacrificados por se encontrarem moribundos. Antes do sacrifício deverão colher-se amostras de sangue de todos os animais para se fazerem fórmulas leucocitárias. Deverão ser considerados todos os tumores ou lesões nitidamente visíveis e as lesões suspeitas de serem tumores. Tentar-se-á estabelecer correlações entre os achados macroscópicos e as observações microscópicas.

Deverão ser conservados todos os órgãos e tecidos para um exame histopatológico. Este procedimento inclui habitualmente os seguintes órgãos e tecidos: encéfalo ⁽³⁾ (medula/protuberância, córtex cerebeloso, córtex cerebral) hipófise, tiroideia (incluindo paratiroideias), timo, pulmões (incluindo traqueia), coração, aorta, glândulas salivares, fígado ⁽³⁾, baço, rins ⁽³⁾, supra-renais ⁽³⁾, esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglios linfáticos, pâncreas, gónadas ⁽³⁾, órgãos genitais anexos, glândula mamária na fêmea, pele, musculatura, nervo periférico, medula espinhal (cervical, torácica, lombar), esterno com medula óssea, e fémur (incluindo articulação) e olhos. A insuflação dos pulmões e bexiga com um fixador é o meio óptimo para preservar estes tecidos; a insuflação dos pulmões nos estudos de inalação é essencial para um exame histopatológico apropriado. Em estudos especiais como os de inalação deve ser estudado todo o sistema respiratório, incluindo o nariz, faringe e laringe.

Se se fizerem outros exames clínicos, a informação obtida deverá estar disponível antes do exame microscópico, uma vez que pode fornecer indicações preciosas ao patologista.

Histopatologia

Deverão ser examinadas microscopicamente todas as alterações visíveis, em particular tumores e outras lesões ocorrendo em qualquer órgão. Além disso são recomendados os seguintes procedimentos:

- a) Exame microscópico de todos os órgãos e tecidos, com uma descrição completa de todas as lesões encontradas em:
 1. Todos os animais que morrerem ou forem sacrificados durante o estudo,
 2. Todos os animais do grupo de dose mais elevada e controlos;
- b) Os órgãos e tecidos apresentando alterações causadas ou possivelmente causadas pela substância testada são também examinados nos grupos de dose mais baixa;
- c) Quando os resultados do teste indicarem uma redução substancial da duração normal da vida dos animais ou uma indução de efeitos que possam afectar a resposta tóxica, deve-se-á examinar os animais do grupo da dose imediatamente inferior, do modo descrito acima;
- d) Informações sobre a incidência de lesões ocorrendo normalmente na estirpe de animais utilizados, nas mesmas condições laboratoriais, isto é, dados de experiências anteriores acerca dos controlos, são indispensáveis para uma avaliação correcta da significância das alterações observadas nos animais tratados.

⁽¹⁾ Actualmente designada transaminase da alanina.

⁽²⁾ Actualmente designada transaminase do aspartato.

⁽³⁾ Estes órgãos, provenientes de dez animais por sexo e por grupo no caso dos roedores deverão ser pesados.

2. **RESULTADOS**

Os resultados deverão ser resumidos em quadros, indicando, para cada grupo de experiência o número de animais no início do teste, o número de animais apresentando lesões e a percentagem de animais apresentando cada tipo de lesões. Os resultados deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

- espécie, estirpe, origem, condições do ambiente, dieta,
- condições experimentais:

Descrição do dispositivo de exposição:

incluindo concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e aerossóis, método de acondicionamento dos animais na câmara de exposição, quando utilizada. Deverá ser descrito o equipamento utilizado para a medição da temperatura, da humidade e, se necessário, da estabilidade da concentração ou a granulometria das partículas.

Dados relativos à experiência

Estes deverão ser apresentados em forma de quadros indicando as médias e uma medida da variação (por exemplo: o desvio-padrão) e deverão incluir:

- a) Os débitos do ar através do dispositivo de inalação;
 - b) A temperatura e a humidade do ar;
 - c) As concentrações nominais (quantidade total da substância a testar introduzida no dispositivo de inalação dividida pelo volume do ar);
 - d) Natureza do veículo, se utilizado;
 - e) Concentrações na zona de respiração;
 - f) Dimensões médias das partículas (se necessário),
- doses (incluindo veículo, se utilizado) e concentrações,
 - resposta tóxica, por sexo e por dose,
 - dose sem efeitos, se possível,
 - momento da morte durante o estudo ou indicação dos animais sobreviventes,
 - descrição dos efeitos tóxicos e outros,
 - momento de observação das manifestações anormais e sua evolução subsequente,
 - observações oftalmológicas,
 - dados relativos à alimentação e peso corporal,
 - testes hematológicos utilizados e todos os seus resultados,
 - testes bioquímicos clínicos empregados e todos os resultados (incluindo todas as análises de urina),
 - resultados da autópsia,
 - descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,
 - tratamento estatístico dos resultados se possível,
 - discussão dos resultados,
 - interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

... B. 31
TESTE DE TERATOGENESE:

ROEDORES E NÃO ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método do ensaio

A substância a testar é administrada em diferentes doses ou concentrações a vários grupos de fêmeas grávidas, pelo menos durante a parte da gestação correspondendo à organogénese, à razão de uma dose por grupo. Pouco tempo antes da data esperada do parto a fêmea é sacrificada, removendo-se o útero e examinando-se o seu conteúdo. Este método de ensaio explora a embriotoxicidade e a toxicidade fetal.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Aclimatizam-se às condições de experiência fêmeas adultas jovens e sãs, nunca tendo acasalado, de idade e tamanhos comparáveis, durante pelo menos cinco dias antes da experiência e depois acasaladas com machos de fecundidade comprovada. As fêmeas inseminadas são repartidas ao acaso entre os grupos tratados.

A fecundação pode ser feita naturalmente ou por inseminação artificial. A substância a testar é administrada diariamente às fêmeas imediatamente após a implantação e durante todo o período de organogénese. Um dia antes do termo, retiram-se os fetos por histerectomia e examinam-se as alterações viscerais ou do esqueleto, incluindo atrasos de crescimento, ossificação tardia e hemorragias intestinais.

Condições experimentais

Animais de experiência

As espécies habitualmente utilizadas são o rato, o ratinho o hamster e o coelho com preferência para o rato e o coelho. Deverão ser utilizadas as estirpes correntes de laboratório. A estirpe utilizada deverá ter uma fecundidade suficiente e será caracterizada pela sua reacção aos agentes teratogénicos. Os animais deverão ser colocados em gaiolas individuais.

Número e sexo

Serão necessários para cada dose pelo menos vinte ratas, ratinhas ou hamsters grávidas ou doze coelhas grávidas. O objectivo é assegurar um número de ninhadas e de crias suficiente para avaliar o potencial teratogénico da substância.

Doses

Serão utilizadas pelo menos três doses diferentes bem como um grupo de controlo. Se a substância a testar for administrada num veículo, deve utilizar-se igualmente um grupo de controlo para o veículo. As propriedades toxicológicas do veículo devem ser conhecidas: não deve existir nenhum efeito teratogénico ou sobre a reprodução. Com excepção da substância a testar, o tratamento do(s) grupo(s) de controlo será idêntico ao dos grupos de

experiência. A menos que a natureza físico/química ou as propriedades biológicas da substância a isso se oponham, a dose mais elevada deverá pôr em evidência, nas condições ideais, uma certa toxicidade nas mães, por exemplo uma ligeira diminuição de peso, mas não deverá provocar a morte de mais de 10%. A dose mais baixa não deverá produzir efeitos observáveis atribuíveis à substância a testar. A(s) dose(s) intermédia(s) deverão situar-se geometricamente entre as doses mais elevada e mais baixa.

Teste limite

No caso de substâncias pouco tóxicas se uma dose de pelo menos 1 000 mg/kg não produzir qualquer efeito tóxico no embrião ou qualquer efeito teratogénico pode considerar-se inútil prosseguir a experiência com outras doses. Se uma dose de menos 1 000 mg/kg evidenciar alguma toxicidade na mãe (como especificado a seguir) mas não tiver nenhum efeito nocivo no embrião, pode considerar-se inútil prosseguir a experiência com outras doses.

Tempo de exposição

O dia 0 é aquele em que se observa a presença dum rolhão vaginal ou de esperma (quando possível). O tratamento deverá cobrir o período da organogénese, ou seja seis a quinze dias para o rato e o ratinho, seis a catorze dias para hamster e seis a dezoito dias para o coelho. Se o dia 0 for o de acasalamento ou de inseminação artificial, acrescentar-se-á um dia a cada um dos períodos mencionados. O período de tratamento pode também ser prolongado até cerca de um dia antes da data presumível do parto.

Período de observação

Será efectuado um exame clínico atento pelo menos uma vez por dia. Serão efectuados exames complementares diariamente tomando-se medidas apropriadas a fim de reduzir a perda de animais do estudo.

Procedimento

A substância a testar é administrada oralmente por *gavage*. Deverá ser administrada sempre à mesma hora todos os dias durante toda a duração do tratamento.

A dose pode ser calculada em função do peso das fêmeas no início do tratamento ou, tendo em conta o rápido aumento de peso durante a gestação, podem ser pesadas periodicamente, adaptando-se a dose ao seu último peso. As manifestações de toxicidade serão registadas à medida que forem surgindo, com indicação da sua intensidade e da sua duração. As fêmeas com sinais de aborto ou de parto prematuro serão sacrificadas e submetidas a um exame macroscópico completo. O período de observação pós-tratamento será prosseguido até cerca de um dia antes do termo. O objectivo é cobrir a maior parte do período de gestação mas evitar as dificuldades duma interpretação dos dados no caso de partos naturais. Durante o período de cativeiro deverão observar-se entre outras as modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, bem como a actividade somato-motora e do comportamento. Deverão determinar-se semanalmente o consumo alimentar bem como o peso dos animais.

Autópsia

No momento da morte, seja no decurso do estudo ou no fim deste, os animais serão objecto dum exame macroscópico a fim de procurar qualquer anomalia estrutural ou quaisquer modificações patológicas susceptíveis de ter influenciado a gestação. Imediatamente após a morte o útero será retirado e o seu conteúdo examinado a fim de revelar o número de embriões ou de fetos mortos bem como o número de fetos vivos. Habitualmente é possível determinar o momento da morte *in utero*. O número de corpos amarelos pode ser determinado nos ratos e nos coelhos. Serão determinados o sexo e o peso de cada feto; os pesos serão anotados e calculado o peso médio. Depois da extração cada feto será objecto dum exame exterior. No caso dos ratos, dos ratinhos e dos hamsters, 33 a 50% dos animais de cada ninhada serão processados e examinados do ponto de vista de anomalias do esqueleto, sendo os restantes processados e examinados para se procurar anomalias das partes moles, usando métodos apropriados. No caso dos coelhos, cada feto será dissecado cuidadosamente para se detectar alterações das vísceras sendo em seguida examinado do ponto de vista de alterações do esqueleto.

2. RESULTADOS

Os dados serão resumidos sob a forma de quadros, indicando para cada grupo da experiência, o número de animais no início do ensaio, o número de fêmeas grávidas, o número e a percentagem de fetos vivos e de fetos apresentando alterações das partes moles ou do esqueleto bem como a sua relação com ninhadas específicas. Os resultados serão avaliados por meio dum método estatístico apropriado. Pode utilizar-se qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório deverá incluir as informações seguintes:

- espécie, estirpe, origem, condições do ambiente, dieta,
- condições experimentais,
- doses (incluindo o veículo, se utilizado) e concentração,
- resposta tóxica por dose,
- dose sem efeitos (se possível),
- momento da morte no decurso da experiência ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,
- descrição dos efeitos tóxicos ou outros,
- momento da observação de todas as manifestações anormais e sua evolução,
- dados relativos à alimentação e peso corporal,
- duração da gestação e informações sobre as ninhadas (incluindo dados publicados anteriormente),
- dados relativos ao feto (vivo/morto, sexo, alterações das partes moles e do esqueleto),
- dados sobre a ninhada (vivo/morto, sexo, alterações das partes moles e esqueleto para cada ninhada),
- tratamento estatístico dos resultados,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 32
TESTE DE CARCINOGENESE

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método do ensaio

A substância a testar é administrada normalmente sete dias por semana, pela via apropriada, a vários grupos de animais de experiência à razão duma dose por cada grupo durante a maior parte da sua vida. Durante e depois da exposição à substância a testar observa-se diariamente os animais de experiência, para se detectarem sinais de toxicidade, em especial a formação de tumores.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e alimentação da experiência durante pelo menos cinco dias antes do teste. Antes de começar o teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

Animais de experiência

A espécie preferida é o rato. Podem utilizar-se outras espécies(roedores ou não roedores) de acordo com resultados de estudos anteriores. Devem utilizar-se animais jovens e sãos de estirpes correntes de laboratório e o tratamento deve começar o mais cedo possível após o desmame. No início da experiência a diferença de peso entre os animais não deverá ultrapassar $\pm 20\%$ do peso médio. Se um estudo de toxicidade subcrónica oral tiver constituído a fase preliminar de um estudo a longo prazo deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

No caso de roedores serão utilizados pelo menos cem animais (cinquenta machos e cinquenta fêmeas) para cada dose e grupo de controlo correspondente. As fêmeas serão nulíparas e não grávidas. Se estiver previsto o sacrifício de animais no decurso da experiência, os efectivos devem ser aumentados do número dos animais cujo sacrifício estiver previsto.

Doses e frequência de exposição

Devem utilizar-se pelo menos três doses além do grupo de contolo correspondente. A dose máxima deverá provocar sinais mínimos de toxicidade tais como um pequeno abrandamento da progressão do peso corporal (menos de 10%), sem alterar substancialmente a duração normal de vida devido a efeitos diferentes de tumores.

A dose mais baixa não deverá alterar o crescimento normal, desenvolvimento e longevidade dos animais, ou produzir qualquer manifestação de toxicidade.

A(s) dose(s) intermédia(s) terá (terão) um valor próximo da média entre a dose máxima e a dose mínima.

Os níveis de dose deverão ter em conta os dados obtidos nos ensaios e estudos de toxicidade efectuados anteriormente.

Normalmente a frequência de exposição será diária. Se a substância a testar for administrada na água de beber ou incorporada na alimentação, deve estar constantemente disponível.

Controlos

Deverá utilizar-se um grupo de controlo idêntico em todos os aspectos aos grupos de tratamento com excepção da exposição à substância a testar.

Em condições especiais, como em estudos por inalação implicando o emprego de aerossóis ou o uso de um emulsionante com actividade biológica não estudada em ensaios por via oral, deverá utilizar-se um grupo suplementar de controlo não exposto ao veículo.

Via de administração

As três principais vias de administração são a oral, cutânea e inalatória. A escolha da via de administração depende das características físico-químicas da substância a testar e da via mais provável de exposição humana.

Estudos por via oral

A via oral de administração é preferida, salvo contra-indicações, se a substância a testar for absorvida pelo tubo digestivo e se a ingestão for uma via possível de exposição humana. Os animais podem receber a substância a testar na dieta, dissolvida na água de beber ou sob a forma de cápsulas.

Em condições ideais, a dose diária será administrada sete dias por cada sete visto que a administração em cinco dias por cada sete pode permitir a recuperação do animal ou a diminuição da toxicidade no período em que o tratamento é interrompido e assim afectar os resultados e a avaliação subsequente. No entanto, por razões essencialmente práticas a administração em cinco dias por sete é considerado aceitável.

Estudos por via cutânea

A exposição cutânea por aplicação com pincel pode ser escolhida para simular uma via principal de exposição humana e também como um modelo experimental para a indução de lesões cutâneas.

Estudos por inalação

Uma vez que os estudos de inalação colocam problemas técnicos de maior complexidade que os por outras vias de administração, são dadas aqui recomendações mais pormenorizadas. Deve notar-se que a instilação endotraqueal pode constituir uma alternativa válida em certas situações específicas.

As exposições prolongadas (de longo prazo) são habitualmente calculadas em função da exposição humana prevista: os animais são expostos cinco dias em cada sete (exposição intermitente) à razão de seis horas por dia depois de se obterem as concentrações na câmara de experiência ou expostos sete dias em cada sete (exposição contínua) à razão de 22 a 24 horas por dia, destinando-se uma hora por dia à alimentação dos animais segundo horário regular e à manutenção das câmaras. Em ambos os casos os animais são habitualmente expostos a uma concentração fixa da substância a testar.

Uma diferença essencial entre a exposição intermitente e a exposição contínua reside no facto de na primeira os animais dispõem dum período de 17 a 18 horas para recuperar dos efeitos da exposição diária e mesmo dum período mais longo durante os fins-de-semana. A escolha entre a exposição intermitente ou contínua será feita em função dos objectivos do estudo e da exposição humana que deve ser simulada. Convém no entanto ter em conta certas dificuldades técnicas: por exemplo as vantagens da exposição contínua na simulação das condições do ambiente podem ser contrariadas pela necessidade de alimentar e dar de beber aos animais e ainda pela necessidade de técnicas mais complicadas de produção de aerossóis e de vapores bem como de monitorização.

Câmaras de exposição

Os animais serão expostos à substância a testar em câmaras de inalação concebidas de forma a conseguir-se um fluxo de ar dinâmico de pelo menos doze renovações de ar por hora, uma concentração de oxigénio adequada e uma distribuição uniforme da substância a testar no ar. As câmaras de exposição e as câmaras de controlo serão idênticas quanto à construção e concepção a fim de garantirem condições de exposição comparáveis em todos os aspectos, com excepção da exposição à substância a testar.

Geralmente mantém-se uma ligeira pressão negativa no interior da câmara para impedir fugas da substância a testar para a área envolvente. As câmaras deverão ser concebidas de forma a evitar a superlotação com os animais de experiência.

Em geral, para assegurar a estabilidade da atmosfera da câmara, o volume total dos animais de experiência não deverá ultrapassar 5% do volume da câmara de exposição.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

- i) Débito do ar: o débito do ar na câmara deverá de preferência ser monitorizado continuamente;
- ii) Concentração: durante o período de exposição diária a concentração da substância a testar não deve variar mais que $\pm 15\%$ em redor do valor médio. Durante toda a duração do estudo as concentrações diárias deverão ser mantidas o mais constantes possível;
- iii) Temperatura e humidade: para os roedores a temperatura deve ser mantida a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a humidade dentro da câmara será de 30 a 70% excepto quando se utilizar água para colocar a substância a testar em suspensão na atmosfera das câmaras. Estes parâmetros serão de preferência monitorizados permanentemente;
- iv) Análise granulométrica das partículas: deverá efectuar-se uma repartição granulométrica das partículas nas atmosferas das câmaras onde se utilizem aerossóis líquidos ou sólidos. As partículas do aerossol deverão ter um diâmetro respirável para o animal de experiência utilizado. Serão retiradas amostras das atmosferas das câmaras de ensaio, na zona de respiração dos animais. A amostra de ar retirada deverá ser representativa da distribuição das partículas a que os animais são expostos e representará numa base gravimétrica, o conjunto do aerossol em suspensão, mesmo se uma grande parte deste não for inalável. As análises granulométricas serão feitas frequentemente durante a elaboração do sistema gerador para assegurar a estabilidade do aerossol, sendo depois feitas tantas vezes quanto as necessárias durante as exposições para determinar de forma adequada a estabilidade das distribuições de partículas a que os animais foram expostos.

Duração do estudo

A duração de um estudo de carcinogénese compreende a maior parte da vida dos animais de experiência. O teste deve terminar aos dezoito meses no ratinho e no hamster e aos vinte e quatro meses no rato; no entanto, no caso de algumas estirpes de animais com maior longevidade e/ou uma frequência baixa de tumores espontâneos, o fim deveria ser aos vinte e quatro meses no ratinho e no hamster e aos trinta meses no rato. Em alternativa, é aceitável terminar um estudo tão prolongado quando o número de sobreviventes do grupo tratado com a dose mais baixa ou do de controlo atingirem 25%. Quando se terminar um teste em que exista uma diferença aparente na resposta consoante o sexo, deverá considerar-se cada sexo separadamente. Quando apenas os animais do grupo tratado com doses mais elevadas morrerem prematuramente por razões óbvias de toxicidade, não é necessário terminar a experiência na condição que as manifestações de toxicidade não causem problemas nos outros grupos. Para que um resultado negativo do teste seja aceitável é preciso que, por cada grupo, não haja mais de 10% de animais perdidos devido à autólise, canibalismo ou por condições impróprias de alojamento e que a taxa de sobrevivência em todos os grupos não seja inferior a 50% depois de dezoito meses no caso do ratinho e do hamster e depois de vinte e quatro meses no caso do rato.

Procedimento

Observações

As observações diárias dos animais em cativeiro deverão incluir alterações da pele e do pêlo, dos olhos e membranas mucosas bem como dos aparelhos respiratório e circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da actividade somatomotora e do comportamento. É necessária uma observação regular dos animais para se evitar, tanto quanto possível, a perda de animais por causas como canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. Os animais moribundos serão imediatamente removidos e autopsiados.

As manifestações clínicas e a mortalidade de todos os animais serão registadas. Deverá tomar-se especial atenção à formação de tumores; deverão registar-se o momento do aparecimento, a localização, as dimensões, o aspecto e a progressão de todos os tumores nitidamente visíveis ou palpáveis.

Deverá determinar-se semanalmente o consumo alimentar (e o consumo de água, quando a substância a testar for administrada na água de beber) durante as primeiras treze semanas de estudo e depois com intervalos de cerca de três meses, excepto quando o estado de saúde dos animais ou o seu peso corporal justificarem outra frequência.

O peso corporal será determinado e registado individualmente uma vez por semana durante as treze primeiras semanas do teste e depois pelo menos de quatro em quatro semanas.

Exames clínicos

Hematologia

Se as observações efectuadas durante o período de cativeiro indicarem uma deterioração do estado de saúde de alguns animais durante o estudo, deverá obter-se uma fórmula leucocitária dos animais afectados.

Deverá efectuar-se a todos os animais um esfregaço de sangue aos doze meses, dezoito meses e antes do sacrifício. Será efectuada uma fórmula leucocitária em amostras dos animais do grupo tratado com a dose mais elevada e dos controlos. Se estes resultados, em especial os obtidos antes do sacrifício ou os provenientes dos exames histopatológicos indicarem necessidade disso, serão obtidas fórmulas leucocitárias dos animais do(s) grupo(s) tratado(s) com a dose imediatamente inferior.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral, incluindo os que morreram no decurso da experiência ou que tenham sido sacrificados por se encontrarem moribundos. Deverão ser conservados todos os tumores ou lesões nitidamente visíveis e as lesões suspeitas de serem tumores.

Deverão ser conservados em meios adequados para um possível exame histopatológico ulterior, os seguintes órgãos e tecidos: encéfalo (incluindo cortes da medula/protuberância, córtex cerebeloso, córtex cerebral), hipófise, tireoideia/paratireoideias, todo o tecido tímico, traqueia e pulmões, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins, supra-renais, pâncreas, gónadas, útero, órgãos genitais anexos, pele, esófago, estômago, duodeno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo, glândula mamária na fêmea, musculatura da coxa, nervo periférico, esterno com medula óssea, fémur (incluindo articulação), medula espinhal a três níveis (cervical, mediotorácico e lombar) e olhos.

A insuflação de um fixador nos pulmões e na bexiga constitui a melhor maneira de preservar estes tecidos; a insuflação dos pulmões nos estudos de inalação é essencial para um exame histopatológico apropriado. Nos estudos de inalação deve conservar-se toda a via respiratória, incluindo as fossas nasais, faringe e laringe.

Exames histopatológicos

- a) Serão submetidos a um exame histopatológico completo os órgãos e tecidos de todos os animais que morrerem ou forem sacrificados durante o teste, nos grupos tratados com a dose mais elevada e de controlo;
- b) Todos os tumores nitidamente visíveis ou as lesões suspeitas de serem tumores deverão ser examinadas microscopicamente, em todos os grupos;
- c) Se se observar uma diferença significativa na incidência de lesões neoplásicas entre o grupo tratado com a dose mais elevada e o de controlo, deverão ser efectuados exames histopatológicos a esses órgãos ou tecidos em particular, nos outros grupos;
- d) Se a sobrevida no grupo tratado com a dose mais elevada for substancialmente inferior à do grupo de controlo, então deverá ser submetido a um exame completo o grupo tratado com a dose imediatamente inferior;
- e) Se no grupo exposto à dose mais elevada se observar uma indução de efeitos tóxicos ou outros susceptíveis de afectar a resposta neoplásica, deverá ser submetido a um exame completo o grupo tratado com a dose imediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser resumidos na forma de quadros, indicando para cada grupo da experiência o número de animais no início, o número de animais apresentando tumores detectados durante o teste, o momento da detecção e o número de animais em que se observaram tumores na autópsia. Os resultados serão avaliados com um método estatístico adequado. Poderá utilizar-se qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

- espécie, estirpe, origem, condições de ambiente, dieta,

— condições experimentais:

Descrição do sistema de exposição:

incluindo concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e aerossóis, método de condicionamento do ar, tratamento do ar expirado e método de acondicionamento dos animais na câmara de exposição se esta for utilizada. Deverá ser descrito o equipamento utilizada para indicação da temperatura, humidade e, se necessário, estabilidade das concentrações do aerosol e granulometria.

Dados relativos à exposição

Deverão ser apresentados na forma de quadros indicando as médias e uma medida de variação (por exemplo: o desvio-padrão) e deverão incluir:

- a) Os débitos do ar através do dispositivo de inalação;
- b) A temperatura e a humidade do ar;
- c) As concentrações nominais (quantidade total da substância a testar introduzida no dispositivo de inalação dividida pelo volume de ar);
- d) Natureza do veículo, se utilizado;
- e) Concentrações na zona de respiração;
- f) Dimensões medianas das partículas (se necessário),

- doses (incluindo veículo, se utilizado) e concentrações,
- incidência dos tumores por sexo, dose e tipo de tumor,
- momento da morte durante o estudo ou indicação dos animais sobreviventes,
- resposta tóxica por sexo e por dose,
- descrição dos efeitos tóxicos e outros,
- momento de observação das manifestações anormais e sua evolução subsequente,
- dados relativos à alimentação e peso corporal,
- resultados do exame hematológico,
- resultados da autópsia,
- descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,
- tratamento estatístico dos resultados e descrição dos métodos utilizados,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 33

TESTE COMBINADO DE TOXICIDADE CRÓNICA/CARCINOGENESE

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O objectivo de um estudo combinado da toxicidade crónica/carcinogénese é determinar os efeitos tóxicos e carcinogénicos de uma substância numa espécie mamífera, após uma exposição prolongada.

Com este fim, o teste de carcinogénese é completado com, pelo menos, um grupo satélite tratado e um grupo satélite de controlo. A dose utilizada para o grupo satélite da dose mais elevada pode ser superior à do grupo tratado com a dose mais elevada no teste de carcinogénese. Os animais no estudo de carcinogénese são examinados do ponto de vista da toxicidade geral bem como da resposta carcinogénica. Os animais do grupo satélite tratado são examinados do ponto de vista da toxicidade geral.

A substância a testar é administrada sete dias por semana, pela via apropriada, a vários grupos de animais de experiência, à razão de uma dose por grupo durante a maior parte da sua vida. Durante e depois da exposição à substância a testar observam-se diariamente os animais de experiência para se detectar manifestações de toxicidade e o aparecimento de tumores.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência, durante pelo menos 5 dias antes do teste. Antes do início do teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

Animais de experiência

A espécie preferida é o rato. Podem utilizar-se outras espécies (roedores ou não roedores) de acordo com os resultados de estudos anteriores. Devem utilizar-se animais jovens e sãos de estirpes correntes de laboratório e o tratamento deve começar o mais cedo possível após de desmame.

No início da experiência a diferença de peso entre os animais não deverá ultrapassar $\pm 20\%$ do peso médio. Se um estudo de toxicidade subcrónica-oral tiver constituído a fase preliminar de um estudo a longo prazo deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

No caso dos roedores serão utilizados pelo menos 100 animais (50 fêmeas e 50 machos) para cada dose e grupo de controlo correspondente. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se estiver previsto o sacrifício de animais no decurso da experiência os efectivos devem ser aumentados do número de animais cujo sacrifício estiver previsto.

O(s) grupo(s) satélite(s) tratado(s) para a avaliação de efeitos patológicos diferentes de tumores, deverá conter 20 animais de cada sexo, enquanto o grupo satélite de controlo deverá conter 10 animais de cada sexo.

Doses e frequência de exposição

Para o estudo da carcinogénese devem utilizar-se pelo menos três doses, além do grupo de controlo correspondente. A dose máxima deverá produzir manifestações mínimas de toxicidade, como um ligeiro decréscimo da progressão de peso (menos de 10%) sem alterar substancialmente o tempo de vida normal devido a efeitos diferentes de tumores.

A dose mínima não deverá interferir com o crescimento normal, desenvolvimento e longevidade do animal ou produzir qualquer efeito tóxico. Em geral não deverá ser inferior a 10% da dose máxima.

A(s) dose(s) intermédia(s) terá(terão) um valor próximo da média entre a dose máxima e a dose mínima.

Os níveis da dose deverão ter em conta os dados obtidos nos ensaios e estudos de toxicidade efectuados anteriormente.

Para o estudo de toxicidade crónica, serão incluídos no estudo outros grupos tratados bem como grupos satélites de controlo correspondentes. A dose máxima administrada aos grupos satélite tratados deverá produzir sinais claros de toxicidade.

A frequência de exposição é, normalmente, diária.

Se a substância química for administrada na água de beber ou incorporada na dieta deve encontrar-se constantemente disponível.

Controlos

Deverá utilizar-se um grupo de controlo idêntico em todos os aspectos aos grupos tratados, com excepção da exposição à substância a testar.

Em condições especiais como em estudos por inalação implicando o emprego de aerossóis ou o uso de um emulsionante com actividade biológica não estudada em ensaios por via oral, deverá utilizar-se um grupo suplementar de controlo que não seja exposto ao veículo.

Via de administração

As três vias principais de administração são a oral, a cutânea e por inalação. A escolha da via de administração depende das características físico-químicas da substância a testar e da via mais provável de exposição humana.

Estudos por via oral

A via oral de administração é preferida salvo contra-indicações, se a substância a testar for absorvida pelo tubo digestivo e se a ingestão for uma via possível de exposição humana. Os animais podem receber a substância a testar na dieta, dissolvida na água de beber ou em cápsulas. Em condições ideais, a dose diária será administrada sete dias em cada sete, visto que a administração em cinco dias por cada sete pode permitir a recuperação do animal ou a diminuição de toxicidade no período em que o tratamento é interrompido e assim afectar os resultados e a avaliação subsequente. No entanto, por razões essencialmente práticas considera-se aceitável a administração cinco dias por semana.

Estudos por via cutânea

A exposição cutânea por aplicação com pincel na pele pode ser escolhida para simular uma via principal de exposição humana e também como modelo experimental para a indução de lesões cutâneas.

Estudos de inalação

Uma vez que os estudos de inalação colocam problemas técnicos de maior complexidade do que os por outras vias de administração, são dadas aqui recomendações mais pormenorizadas. Deve notar-se que a instilação endotraqueal pode constituir uma alternativa válida em certas situações específicas.

As exposições prolongadas (de longo prazo) são habitualmente calculadas em função da exposição humana prevista: os animais são expostos cinco dias em cada sete (exposição intermitente) à razão de seis horas por dia depois de se obterem as concentrações na câmara de experiência ou expostos sete dias em cada sete (exposição contínua) à razão de 22 a 24 horas por dia, destinando-se uma hora por dia à alimentação dos animais, segundo um horário regular, e à manutenção das câmaras. Em ambos os casos os animais são habitualmente expostos a uma concentração fixa da substância a testar.

Uma diferença essencial entre a exposição intermitente e a contínua reside no facto de na primeira os animais dispõem de um período de 17 a 18 horas para recuperar dos efeitos da exposição diária e mesmo dum período mais longo, durante os fins-de-semana.

A escolha entre a exposição intermitente ou contínua será feita em função dos objectivos do estudo e da exposição humana que deve ser simulada. Convém, no entanto, ter em conta certas dificuldades técnicas: por exemplo, as vantagens da exposição contínua na simulação das condições do ambiente podem ser contrariadas pela necessidade de alimentar e dar de beber aos animais e ainda pela necessidade de técnicas mais complicadas de produção de aerossóis e de vapores bem como de monitorização.

Câmaras de exposição

Os animais não expostos à substância a testar em câmaras de inalação concebidas de forma a conseguir-se um fluxo de ar dinâmico de pelo menos doze renovações de ar por hora, uma concentração de oxigénio adequada e uma distribuição uniforme da substância a testar no ar. As câmaras de exposição e as câmaras de controlo serão idênticas quanto à construção e concepção a fim de garantirem condições de exposição comparáveis em todos os aspectos, com excepção da exposição à substância a testar. Geralmente mantém-se uma ligeira pressão negativa no interior da câmara para impedir fugas da substância a testar para a área envolvente. As câmaras deverão ser concebidas de forma a evitar a superlotação com os animais de experiência. Em geral, para assegurar a estabilidade da atmosfera da câmara, o volume total dos animais de experiência não deverá ultrapassar 5 % do volume da câmara de exposição.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

- i) Débito de ar: o débito de ar na câmara deverá, de preferência, ser monitorizado continuamente;
- ii) Concentração: durante o período de exposição diária a concentração da substância a testar não deve variar mais que $\pm 15\%$ em redor do valor médio;
- iii) Temperatura e humidade: para os roedores a temperatura deve ser mantida a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a humidade dentro da câmara será de 30 a 70 % excepto quando se utilizar água para colocar a substância testada em suspensão na atmosfera da câmara. Estes parâmetros serão, de preferência, monitorizados permanentemente;
- iv) Análise granulométrica das partículas: deverá efectuar-se uma distribuição granulométrica das partículas nas atmosferas das câmaras onde se utilizam aerossóis líquidos ou sólidos. As partículas do aerossol deverão ter um diâmetro respirável para o animal de experiência utilizado. Serão retiradas amostras das atmosferas das câmaras de ensaio, na zona de respiração dos animais. A amostra de ar retirada deverá ser representativa da distribuição das partículas a que os animais são expostos e representará, numa base gravimétrica, o conjunto do aerossol em suspensão, mesmo se uma grande parte deste não for inalável. As análises granulométricas serão feitas frequentemente durante a elaboração do sistema gerador para assegurar a estabilidade do aerossol sendo depois feitas tantas vezes quanto as necessárias durante as exposições para determinar de forma adequada a estabilidade das distribuições de partículas a que os animais foram expostos.

Duração do estudo

A duração da parte dedicada à carcinogénese compreende a maior parte da vida dos animais de experiência. O teste deve terminar aos 18 meses no ratinho e hamster e aos 24 meses no rato; no entanto, no caso de algumas estirpes de animais com maior longevidade e/ou uma frequência baixa de tumores espontâneos o fim deveria ser aos 24 meses no ratinho e no hamster e aos 30 meses no rato. Em alternativa é aceitável terminar um estudo tão prolongado quando o número de sobreviventes do grupo tratado com a dose mais baixa ou do de controlo atingirem 25 %. Quando se terminar um teste em que exista uma diferença aparente na resposta consoante o sexo, deverá considerar-se cada sexo separadamente. Quando apenas animais do grupo tratado com a dose mais elevada morrerem prematuramente por razões óbvias de toxicidade não é necessário terminar a experiência, na condição de que as manifestações de toxicidade não causem problemas nos outros grupos. Para que um resultado negativo dum teste seja aceitável é preciso que, por cada grupo, não haja mais de 10 % de animais perdidos devido a autólise, canibalismo ou problemas de manutenção e que a taxa de sobrevida em todos os grupos não seja inferior a 50 % depois de 18 meses no caso do ratinho e do hamster e depois de 24 meses no caso do rato.

Os grupos satélite de 20 animais tratados por sexo e os 10 animais de controlo por sexo associados, utilizados para o teste da toxicidade crónica, deverão ser conservados no estudo durante 12 meses pelo menos. Estes animais deverão ser escalados para sacrifício para uma avaliação da patologia relacionada com a substância a testar, não complicada por alterações geriátricas.

Procedimento

Observações

As observações diárias dos animais em cativeiro deverão incluir alterações da pele e do pêlo, olhos e membranas mucosas bem como dos aparelhos respiratório e circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da actividade somatomotora e do comportamento.

Os exames clínicos deverão ser efectuados com intervalos adequados aos animais dos grupos satélite tratados.

É necessário uma observação regular dos animais para se evitar, tanto quanto possível, a perda de animais por causas como o canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. Os animais moribundos serão imediatamente removidos e autopsiados.

As manifestações clínicas, incluindo alterações neurológicas e oculares, bem como a mortalidade de todos os animais, serão registadas. Deverá tomar-se especial atenção à formação de tumores; deverão registar-se o momento do aparecimento, a localização, as dimensões, o aspecto e a progressão de todos os tumores nitidamente visíveis ou palpáveis. O início e a progressão das manifestações tóxicas devem ser registados.

Deverá determinar-se semanalmente o consumo alimentar (e o consumo de água, quando a substância a testar for administrada na água de beber), durante as primeiras 13 semanas de estudo e depois com intervalos de cerca de três meses, excepto quando o estado de saúde dos animais ou o seu peso corporal indicarem a necessidade de outra frequência.

O peso corporal será determinado e registado individualmente em todos os animais uma vez por semana durante as 13 primeiras semanas do teste e depois pelo menos de quatro em quatro semanas.

Exames clínicos

Hematologia

Deverá ser efectuado um exame hematológico (por exemplo, concentração de hemoglobina, hematócrito, número total de eritrócitos, número total de leucócitos, plaquetas ou outros testes de coagulação) aos três meses, aos seis meses, e em seguida a intervalos de seis meses e no fim da experiência, em amostras de sangue recolhidas de dez ratos/sexo de cada grupo. Se possível, as amostras deveriam ser colhidas de cada vez nos mesmos ratos.

Se as observações efectuadas durante o período de cativeiro indicarem uma deterioração do estado de saúde de alguns animais durante o estudo, deverá obter-se uma fórmula leucocitária dos animais afectados.

Deverá obter-se uma fórmula leucocitária em amostras de sangue dos animais do grupo tratado com a dose mais elevada e dos controlos. Serão obtidas fórmulas no(s) grupo(s) tratado(s) com doses inferiores apenas no caso de se verificar uma grande discrepância entre o grupo tratado com a dose mais alta e os controlos, ou se indicado pelos achados patológicos.

Análise de urina

Serão colhidas amostras de urina para análise em dez ratos/sexo de todos os grupos; estas análises serão feitas se possível na mesma altura dos exames hematológicos. Deverão ser efectuadas as seguintes determinações, em cada animal individualmente ou, no caso dos roedores, numa *pool* de urina do mesmo grupo e do mesmo sexo:

- aspecto: volume e densidade para os animais tomados individualmente,
- proteínas, glicose, corpos cetónicos, sangue oculto (semi-quantitativamente),
- microscopia do sedimento urinário (semi-quantitativamente).

Bioquímica clínica

De seis em seis meses e no fim do estudo colher-se-ão amostras de sangue para determinações bioquímicas clínicas de todos os não roedores e a dez ratos/sexo de todos os grupos, e se possível, sempre dos mesmos ratos de cada vez. Além disso, será recolhida uma amostra pré-teste dos não roedores. O plasma preparado a partir destas amostras será utilizado para as seguintes determinações:

- concentração de proteínas totais,
- concentração de albumina,
- provas de função hepática (tais como a actividade da fosfatase alcalina, actividade da transaminase glutâmico-pirúvica ⁽¹⁾ e da transaminase glutâmico-oxaloacética ⁽²⁾, gama-glutamil transpeptidase, ornitina-decarboxilase,
- metabolismo dos hidratos de carbono como uma glicémia em jejum,
- testes da função renal como a ureia sanguínea.

⁽¹⁾ Designada actualmente por transaminase da alanina.

⁽²⁾ Designada actualmente por transaminase da aspartato.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral, incluindo os que morrerem no decurso da experiência ou que tenham sido sacrificados por se encontrarem moribundos. Antes do sacrifício deverão colher-se amostras de sangue de todos os animais para se fazerem fórmulas leucocitárias. Deverão ser conservados todos os tumores ou lesões nitidamente visíveis e as lesões suspeitas de serem tumores. Tentar-se-á estabelecer correlações entre os achados macroscópicos e as observações microscópicas.

Deverão ser conservados todos os órgãos e tecidos para um exame histopatológico. Este procedimento inclui habitualmente os seguintes órgãos e tecidos: encéfalo (medula/protuberância, córtex cerebeloso, córtex cerebral), hipófise, tireoideia (incluindo paratiroides), timo, pulmões (incluindo traqueia), coração, aorta, glândulas salivares, fígado⁽¹⁾, baço, rins⁽¹⁾, supra-renais⁽¹⁾, esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglios linfáticos, pâncreas, gónadas, órgãos genitais anexos, glândula mamária na fêmea, pele, musculatura, nervo periférico, medula espinhal (cervical, torácica, lombar), esterno com medula óssea e fémur (incluindo articulação) e olhos.

Apesar da insuflação dos pulmões e bexiga com um fixador ser o meio óptimo de preservar os tecidos nos estudos da inalação, a insuflação dos pulmões é uma condição necessária para um exame histopatológico adequado. Em estudos especiais como os de inalação deve ser estudado todo o sistema respiratório, incluindo o nariz, faringe e laringe.

Se se fizerem outros exames clínicos, a informação obtida deverá estar disponível antes do exame microscópico, uma vez que pode fornecer indicações preciosas ao patologista.

Histopatologia

Para a parte referente ao teste de toxicidade crónica

Será efectuado um exame pormenorizado de todos os órgãos conservados de todos os animais do grupo satélite tratado com a dose mais elevada e do de controlo. Quando se observar uma patologia ligada à substância a testar no grupo satélite de dose mais elevada, os órgãos alvo de todos os outros animais em qualquer dos outros grupos satélites tratados deverão ser sujeitos a um exame histológico completo e pormenorizado bem como os dos grupos tratados no teste de carcinogénese, no fim desta parte do estudo.

Para a parte referente ao teste de carcinogénese

- a) Serão submetidos a um exame histopatológico completo os órgãos e tecidos de todos os animais que morrerem ou forem sacrificados durante o teste e de todos os animais do grupo de controlo e de dose máxima;
- b) Deverão ser examinados microscopicamente todos os tumores nitidamente visíveis ou lesões suspeitas de serem tumores;
- c) Se se verificar uma diferença significativa entre a incidência de lesões neoplásicas no grupo da dose mais alta e no de controlo, deverá ser efectuado um exame histopatológico desse órgão ou tecido específico nos outros grupos;
- d) Se a sobrevida do grupo de dose mais alta for substancialmente inferior à do grupo de controlo, deverá então ser submetido a um exame completo o grupo tratado com a dose imediatamente inferior;
- e) Se no grupo exposto à dose mais elevada se observarem efeitos tóxicos ou outros susceptíveis de afectar a resposta neoplásica, serão submetidos a um exame completo os animais expostos à dose imediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser resumidos na forma de quadros, indicando para cada grupo de experiência o número de animais no início do teste, o número de animais apresentando tumores ou manifestações de toxicidade detectados durante o teste, o momento da detecção e o número de animais apresentando tumores na autópsia. Os resultados deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, condições de ambiente, dieta,

⁽¹⁾ Estes órgãos, provenientes de 10 animais por sexo e por grupo no caso dos roedores, deverão ser pesados.

— condições experimentais:

Descrição do dispositivo de exposição:

incluindo concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e aerossóis, método de condicionamento de ar, tratamento do ar expirado, e o modo de acondicionamento dos animais na câmara de exposição, quando utilizada. Deverá ser descrito o equipamento para a medição de temperatura, da humidade e, se necessário, da estabilidade da concentração ou a granulometria das partículas;

Dados relativos à exposição:

Estes deverão ser apresentados na forma de quadros indicando as médias e uma medida de variação (por ex., o desvio-padrão) e deverão incluir:

- a) Os débitos do ar através do dispositivo de inalação;
- b) A temperatura e a humidade do ar;
- c) As concentrações nominais (quantidade total da substância a testar introduzida no dispositivo de inalação dividida pelo volume de ar);
- d) Natureza do veículo, se utilizado;
- e) Concentrações na zona de respiração;
- f) Dimensões médias das partículas (se necessário);

- doses (incluindo veículo, se utilizado) e concentrações,
- incidência dos tumores por sexo, dose e tipo de tumor,
- momento da morte durante o estudo ou indicação dos animais sobreviventes, incluindo o grupo satélite,
- resposta tóxica, por sexo e por dose,
- descrição dos efeitos tóxicos e outros,
- momento de observação das manifestações anormais e sua evolução subsequente,
- observações oftalmológicas,
- dados relativos à alimentação e peso corporal,
- testes hematológicos utilizados e todos os seus resultados,
- testes bioquímicos clínicos empregados e todos os seus resultados (incluindo todas as análises de urina),
- resultados da autópsia,
- descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,
- tratamento estatístico dos resultados e descrição dos métodos utilizados,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 34

TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM UMA GERAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Administra-se a substância a testar em várias doses graduais a vários grupos de animais, machos e fêmeas. Os machos deverão ser tratados durante o crescimento e pelo menos um ciclo espermatogénico completo (cerca de 56 dias no ratinho e 70 dias no rato) de forma que a substância testada provoque um efeito nocivo eventual na espermatogénese.

As fêmeas da geração progenitora (P) deverão ser tratadas durante pelo menos dois ciclos do estro para permitir que a substância testada provoque alguns efeitos nocivos no estro. Os animais são em seguida acasalados. Administra-se a substância testada aos animais de ambos os sexos durante o período de acasalamento, e depois unicamente às fêmeas durante a gestação e o período de aleitamento.

Se se administrar a substância por inalação será necessário modificar-se o método.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Antes do ensaio, os animais adultos jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos tratados e de controlo. Os animais são mantidos nas condições de alojamento e alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do início do teste. Recomenda-se a administração da substância a testar na alimentação ou na água de beber. Podem aceitar-se igualmente outras vias de administração. Deve utilizar-se o mesmo método de administração em todos os animais e durante toda a experiência. Se for utilizado um veículo ou outros aditivos para facilitar a administração devem estes ser comprovadamente isentos de efeitos tóxicos. O tratamento deverá ser efectuado durante os 7 dias da semana.

Animais de experiência

Seleção da espécie

As espécies preferidas são o rato ou o ratinho. Devem utilizar-se animais sãos, não sujeitos a experiências anteriores. As estirpes com taxas de fecundidade baixa não deverão ser utilizadas. Serão especificadas a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais de experiência.

Para avaliar a fecundidade de modo adequado deverão ser estudados tanto machos como fêmeas. Todos os animais tratados e de controlo deverão estar desmamados antes do início do tratamento.

Número e sexo

Cada grupo tratado e cada grupo de controlo deve comportar um número de animais suficientes para obter cerca de 20 fêmeas grávidas de termo ou próximas deste.

O objectivo é a obtenção dum número de gestações e de ninhadas suficientes para permitir uma avaliação significativa do efeito da substância sobre a fecundidade, a gestação, o comportamento maternal dos animais da geração P bem como o aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F₁ desde a concepção até ao desmame.

Condições experimentais

A alimentação e a água serão fornecidas *ad libitum*. Quando as fêmeas grávidas estiverem próximas do termo deverão ser colocadas em gaiolas individuais de parto ou de maternidade podendo ser-lhes fornecidos os materiais de nidificação necessários.

Doses

Devem utilizar-se pelo menos três grupos tratados e um grupo de controlo. Se for utilizado um veículo para a administração da substância a testar o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de veículo que tenha sido utilizado. Se uma substância testada causar diminuição da ingestão de alimentos e da sua assimilação, pode tornar-se necessário um grupo de controlo negativo. Nas condições ideais, a não ser que existam limitações devidas à natureza físico-química ou efeitos biológicos da substância testada, a dose máxima deverá produzir um efeito tóxico mas não a morte dos animais progenitores (P). A(s) dose(s) intermédia(s) deverão induzir os efeitos tóxicos mínimos atribuíveis à substância a testar e a dose mínima não deverá produzir nenhum efeito nocivo observável nos progenitores ou na sua descendência. Quando a substância for administrada por gavagem ou cápsula, a dose administrada a cada animal deverá ser calculada em função do peso corporal de cada um e ajustada semanalmente, tendo em conta modificações desse peso. No caso das fêmeas durante a gravidez, as doses podem ser calculadas em função do peso corporal no dia 0 ou 6, se desejado.

Teste limite

No caso de substâncias pouco tóxicas, se uma dose de pelo menos 1 000 mg/kg de peso não provocar nenhuns sinais de interferência com a capacidade de reprodução, podem considerar-se desnecessários estudos com outras doses. Se um estudo preliminar da dose máxima, com toxicidade materna evidente, não mostrar efeitos nocivos na fertilidade, poderão considerar-se desnecessários estudos com outras doses.

Procedimentos do teste

Plano de experiência

A substância a testar deverá ser administrada diariamente aos machos progenitores (P) assim que atingirem a idade de cinco a nove semanas depois do desmame e de um período de adaptação de, pelo menos, cinco dias. Nos ratos o tratamento é prosseguido durante dez semanas antes do período de acasalamento (nos ratinhos durante oito semanas). Os machos deverão ser sacrificados e examinados no fim do período de acasalamento ou em alternativa mantidos vivos prosseguindo-se com a administração da substância na comida, com vista à produção eventual duma segunda ninhada, devendo neste caso ser sacrificados e examinados um pouco antes do fim do estudo. No caso das fêmeas (P) o tratamento deverá começar depois de, pelo menos, cinco dias de adaptação e ser prosseguido durante, pelo menos, duas semanas antes do acasalamento. As fêmeas P deverão continuar a receber o seu tratamento diário durante as três semanas do período de acasalamento e gestação até ao desmame dos filhos F₁. Poderão admitir-se modificações do esquema de administração no caso de se disporem de outras informações sobre a substância testada, como a indução do metabolismo ou bio-acumulação.

Processo de acasalamento

Nos estudos de toxicidade sobre a reprodução, os acasalamentos poderão ser feitos seja 1:1 (um macho com uma fêmea) seja 1:2 (um macho com duas fêmeas).

No caso de um acasalamento 1:1 deve colocar-se a fêmea sempre com o mesmo macho até ficar grávida ou durante três semanas. Deverão examinar-se as fêmeas todas as manhãs para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gestação é definido como o dia em que se verifique a presença de rolhão vaginal ou de esperma.

Os casais em que o acasalamento não tiver sucesso devem ser avaliados para determinar as causas da aparente esterilidade. Isto pode implicar procedimentos como novo acasalamento com animais que já tenham procriado, proceder a um exame microscópico dos órgãos de reprodução ou ao exame do ciclo do estro ou da espermatogénese.

Número de animais por ninhada

Permite-se que os animais usados no estudo de fertilidade dêem à luz normalmente e criem a sua descendência até ao desmame sem homogeneização das ninhadas.

Se se fizer uma homogeneização das ninhadas sugere-se o seguinte método: entre o dia 1 e o dia 4 depois do nascimento, o número de animais por ninhada pode ser ajustado eliminando-se por selecção as crias suplementares a fim de obter, na medida do possível, quatro fêmeas e quatro machos por ninhada. Se o número de machos e de fêmeas não permitir obter quatro crias de cada sexo por ninhada pode aceitar-se um ajustamento parcial (por exemplo cinco machos e três fêmeas). Não são possíveis ajustamentos nas ninhadas com menos de oito crias.

Observações

Deve observar-se cada animal pelo menos uma vez por dia durante todo o período do ensaio. Deverão registar-se as modificações de comportamento significativas, sinais de parto difícil ou prolongado bem como qualquer sinal de toxicidade incluindo a mortalidade. Durante os períodos de pré-acasalamento e acasalamento deve determinar-se diariamente o consumo alimentar. Depois do parto e durante o aleitamento deverá determinar-se o consumo alimentar (e o consumo de água quando o teste da substância for administrado na água para beber) no dia de se pesarem as crias. Os machos e fêmeas progenitores deverão ser pesados no primeiro dia do tratamento e, em seguida, uma vez por semana. Estas observações serão registadas individualmente para cada animal adulto. Calcula-se a duração da gestação a partir do dia 0 da gravidez. Cada ninhada deverá ser examinada o mais cedo possível, após o parto, para se determinar o número e o sexo das crias, os nado-mortos, os nado-vivos e a presença de anomalias macroscópicas.

As crias mortas e as crias sacrificadas no dia 4 deverão ser conservadas e examinadas para detectar eventuais anomalias. Devem contar-se as crias vivas e pesar as ninhadas na manhã após o nascimento, bem como no 4º e 7º dia e, em seguida, semanalmente até ao fim do estudo, sendo os animais nessa altura pesados individualmente. Deverão ser registadas as alterações físicas ou de comportamento nos progenitores do sexo feminino e na sua descendência.

Patologia

Autópsia

No momento do sacrifício ou da morte, no decurso do estudo, os animais da geração P deverão ser examinados macroscopicamente para se detectar qualquer anomalia estrutural ou alteração patológica, dedicando-se uma atenção especial aos órgãos do aparelho reprodutor. Devem procurar-se eventuais malformações nas crias mortas ou moribundas.

Histopatologia

Devem conservar-se para exame microscópico os ovários, o útero, o colo uterino, a vagina, os testículos, os epidídimos, as vesículas seminais, a próstata, a glândula coagulante, a hipófise e o(s) órgão(s) alvo de todos os animais P. No caso de estes órgãos não terem sido examinados noutros estudos com doses repetidas, deverão ser feitos exames histológicos a todos os animais do grupo tratado com dose mais elevada, do grupo de controlo e aos animais mortos durante o estudo, quando tal for praticável.

Os órgãos que apresentarem alterações nestes animais serão também examinados em todos os outros animais P. Neste caso deverá efectuar-se um exame microscópico de todos os tecidos que apresentarem alterações patológicas macroscópicas. Como foi já sugerido no procedimento para o acasalamento, os órgãos reprodutores dos animais suspeitos de esterilidade poderão ser submetidos a um exame microscópico.

2. RESULTADOS

Os resultados podem ser resumidos em quadros, indicando para cada grupo experimental o número de animais no início do estudo, o número de machos férteis, o número de fêmeas grávidas, os diversos tipos de alterações, e a percentagem de animais apresentando cada tipo de alteração.

Se possível, os resultados numéricos deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá também incluir as seguintes informações:

- espécie/estirpe utilizada,
- resposta tóxica por sexo e por dose, incluindo fertilidade, gestação e viabilidade,

- momento da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no fim do estudo,
- quadro apresentando os pesos de cada ninhada, o peso médio das crias e os pesos individuais das crias no fim do estudo,
- efeito tóxico ou outro sobre a reprodução, a descendência e o crescimento pós-natal,
- dia da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução subsequente,
- peso corporal dos animais P,
- resultados da autópsia,
- descrição pormenorizada das observações microscópicas,
- tratamento estatístico dos resultados se necessário,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 35
TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM DUAS GERAÇÕES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Administra-se a substância a testar em várias doses graduais a vários grupos de animais, machos e fêmeas. Os machos da geração paterna (P) deverão ser tratados durante o crescimento e pelo menos um ciclo espermatogénico completo (cerca de 56 dias no ratinho e 70 dias no rato) de forma que a substância testada provoque um efeito nocivo eventual na espermatogénese.

As fêmeas da geração progenitora (P) deverão ser tratadas durante pelo menos dois ciclos do estro para permitir que a substância testada provoque alguns efeitos nocivos no estro. Os animais são em seguida acasalados. Administra-se a substância testada aos animais de ambos os sexos durante o período de acasalamento, e depois unicamente às fêmeas durante a gestação e o período de aleitamento. Na ocasião do desmame continua a administrar-se a substância à geração F₁ durante o crescimento até à idade adulta, ao acasalamento e produção de uma geração F₂, até ao desmame da geração F₂. Se se administrar a substância por inalação será necessário modificar-se o método.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Antes do ensaio os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos tratados e de controlo. Os animais da geração (P) são mantidos nas condições de alojamento e alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do início do teste. Recomenda-se a administração da substância a testar na alimentação ou na água de beber. Podem aceitar-se igualmente outras vias de administração. Deve utilizar-se o mesmo método de administração em todos os animais e durante toda a experiência. Se for utilizado um veículo ou outros aditivos para facilitar a administração, devem estes ser comprovadamente isentos de efeitos tóxicos. O tratamento deverá ser efectuado durante os sete dias da semana.

Animais de experiência: Selecção da espécie

As espécies preferidas são o rato ou o ratinho. Devem utilizar-se animais P sãos, não sujeitos a experiências anteriores. As estirpes com taxas de fecundidade baixa não deverão ser utilizadas. Serão especificadas a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais de experiência.

Para avaliar a fecundidade de modo adequado deverão ser estudados tanto machos como fêmeas. Todos os animais tratados e de controlo deverão estar desmamados antes do início do tratamento.

Número e sexo

Cada grupo tratado e cada grupo de controlo deve comportar um número de animais suficiente para obter cerca de 20 fêmeas grávidas de termo ou próximas deste. O objectivo é a obtenção dum número de gestações e de ninhadas suficientes para permitir uma avaliação significativa do efeito da substância sobre a fecundidade, a gestação, o

comportamento maternal dos animais da geração P bem como o aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F₁ desde a concepção até à maternidade, assim como o desenvolvimento da sua descendência (F₂) até ao desmame.

Condições experimentais

A alimentação e a água serão fornecidas *ad libitum*. Quando as fêmeas grávidas estiverem próximas do termo deverão ser colocadas em gaiolas individuais de parto ou de maternidade podendo ser-lhes fornecidos os materiais de nidificação necessários.

Doses

Devem utilizar-se pelo menos três grupos tratados e um grupo de controlo. Se for utilizado um veículo para a administração da substância a testar o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de veículo que tenha sido utilizado. Se uma substância testada causar diminuição da ingestão de alimentos e da sua assimilação, pode tornar-se necessário um grupo de controlo negativo. Nas condições ideais, a não ser que existam limitações devidas à natureza físico-química ou efeitos biológicos da substância testada, a dose máxima deverá produzir um efeito tóxico mas não a morte dos animais progenitores (P). A(s) dose(s) intermédia(s) deverão induzir os efeitos tóxicos mínimos atribuíveis à substância a testar e a dose mínima não deverá produzir nenhum efeito nocivo observável nos progenitores ou na sua descendência. Quando a substância for administrada por gavagem ou cápsula, a dose administrada a cada animal deverá ser calculada em função do peso corporal de cada um e ajustada semanalmente, tendo em conta modificações desse peso. No caso das fêmeas durante a gravidez, as doses podem ser calculadas em função do peso corporal no dia 0 ou 6, se desejado.

Teste limite

No caso de substâncias pouco tóxicas, se uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de peso não provocar nenhuns sinais de interferência com a capacidade de reprodução, podem considerar-se desnecessários estudos com outras doses. Se um estudo preliminar da dose máxima, com toxicidade materna evidente, não mostrar efeitos nocivos na fertilidade, poderão considerar-se desnecessários estudos com outras doses.

Procedimentos do teste

Plano da experiência

A substância a testar deverá ser administrada diariamente aos machos progenitores (P) assim que atingirem a idade de cinco a nove semanas depois do desmame e de um período de adaptação de pelo menos cinco dias. Nos ratos o tratamento é prosseguido durante dez semanas antes do período de acasalamento (nos ratinhos durante oito semanas). Os machos deverão ser sacrificados e examinados ou no fim do período de acasalamento ou em alternativa mantidos vivos prosseguindo-se com a administração da substância na comida, com vista à produção eventual duma segunda ninhada, devendo neste caso ser sacrificados e examinados um pouco antes do fim do estudo. No caso das fêmeas (P) o tratamento deverá começar depois de pelo menos cinco dias de adaptação e ser prosseguido durante pelo menos duas semanas antes do acasalamento. As fêmeas P deverão continuar a receber o seu tratamento diário durante as três semanas do período de acasalamento e gestação até ao desmame dos filhos F₁. Poderão admitir-se modificações do esquema de administração no caso de se disporem de outras informações sobre a substância testada, como a indução do metabolismo ou a bio-acumulação.

O tratamento dos animais F₁ começa na ocasião do desmame e termina quando são sacrificados.

Processo de acasalamento

Nos estudos de toxicidade sobre a reprodução, os acasalamentos poderão ser feitos seja 1:1 (um macho com uma fêmea) seja 1:2 (um macho com duas fêmeas).

No caso de um acasalamento 1:1 deve colocar-se a fêmea sempre com o mesmo macho até ficar grávida ou durante três semanas. Deverão examinar-se as fêmeas todas as manhãs para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gestação é definido como o dia em que se verifique a presença de rolhão vaginal ou de esperma.

Tendo em conta a espermatogénese, a descendência F₁ não poderá ser acasalada até que ela atinja a idade de, pelo menos, onze semanas nos ratinhos e treze semanas nos ratos. Para o acasalamento da descendência F₁, são seleccionados ao acaso, um macho e uma fêmea de cada ninhada, com vista a um acasalamento cruzado com uma cria de uma outra ninhada, com o mesmo grupo de dosagem, tendo em vista a obtenção da geração F₂. Os machos e fêmeas F₁ que não tenham sido seleccionados para o acasalamento serão sacrificados na ocasião do desmame.

Os casais em que o acasalamento não tiver sucesso devem ser avaliados para determinar as causas da aparente esterilidade. Isto pode implicar procedimentos como novo acasalamento com animais que já tenham procriado, proceder a um exame microscópico dos órgãos de reprodução ou ao exame do ciclo do estro ou da espermatogénese.

Número de animais por ninhada

Permite-se que os animais usados no estudo de fertilidade dêem à luz normalmente e criem a sua descendência até ao desmame sem homogeneização das ninhadas.

Se se fizer uma homogeneização das ninhadas sugere-se o seguinte método: entre o dia 1 e o dia 4 depois do nascimento, o número de animais por ninhada pode ser ajustado eliminando-se por selecção as crias suplementares a fim de obter, na medida do possível, quatro fêmeas e quatro machos por ninhada. Se o número de machos e de fêmeas não permitir obter quatro crias de cada sexo por ninhada pode aceitar-se um ajustamento parcial (por exemplo, cinco machos e três fêmeas). Não são possíveis ajustamentos nas ninhadas com menos de oito crias. Para as ninhadas F_2 o ajustamento efectua-se da mesma maneira.

Observações

Deve observar-se cada animal pelo menos uma vez por dia durante todo o período do ensaio. Deverão registar-se as modificações de comportamento significativas, sinais de parto difícil ou prolongado bem como qualquer sinal de toxicidade incluindo a mortalidade. Durante os períodos de pré-acasalamento e acasalamento deve determinar-se diariamente o consumo alimentar. Depois do parto e durante o aleitamento deverá determinar-se o consumo alimentar no dia de se pesarem as crias. Os machos e fêmeas progenitores (P e F_1) deverão ser pesados no primeiro dia do tratamento e, em seguida, uma vez por semana. Estas observações serão registadas individualmente para cada animal adulto.

Calcula-se a duração da gestação a partir do dia 0 da gravidez. Cada ninhada deverá ser examinada o mais cedo possível após o parto para se determinar o número e o sexo das crias, os nado-mortos, os nado-vivos e a presença de anomalias macroscópicas.

As crias mortas e as crias sacrificadas no dia 4 deverão ser conservadas e examinadas para detectar eventuais anomalias. Devem contar-se as crias vivas e pesar as ninhadas na manhã, após o nascimento, bem como no 4^o e 7^o dia e, em seguida, semanalmente até ao fim do estudo, sendo os animais nessa altura pesados individualmente. Deverão ser registadas as alterações físicas ou de comportamento nos progenitores do sexo feminino e na sua descendência.

Patologia

Autópsia

Todos os animais P e F_1 deverão ser sacrificados quando deixarem de ser necessários para se avaliar os efeitos sobre a reprodução. A descendência F_1 não seleccionada para o acasalamento bem como toda a descendência F_2 deverão ser sacrificadas na ocasião do desmame.

No momento do sacrifício ou da morte, no decurso do estudo, os animais da geração P e F_1 deverão ser examinados microscopicamente para se detectar qualquer anomalia estrutural ou alteração patológica, dedicando-se uma atenção especial aos órgãos do aparelho reprodutor. Devem procurar-se eventuais malformações nas crias mortas ou moribundas.

Histopatologia

Devem conservar-se para exame microscópico os ovários, o útero, o colo uterino, a vagina, os testículos, os epidídimos, as vesículas seminais, a próstata, a glândula coagulante, a hipófise e o (s) órgão(s) alvo de todos os animais P e F_1 . No caso de estes órgãos não terem sido examinados noutros estudos com doses repetidas, deverão ser feitos exames histológicos a todos os animais do grupo tratado com a dose mais elevada, ao grupo de controlo e aos animais mortos durante o estudo, quando tal for praticável.

Os órgãos que apresentarem alterações nestes animais serão também examinados em todos os animais dos grupos tratados com outras doses. Neste caso deverá efectuar-se um exame microscópico de todos os tecidos que apresentarem alterações patológicas macroscópicas. Como foi já sugerido no procedimento para o acasalamento, os órgãos reprodutores dos animais suspeitos de esterilidade poderão ser submetidos a um exame microscópico.

2. RESULTADOS

Tratamento dos resultados

Os resultados podem ser resumidos em quadros, indicando para cada grupo experimental o número de animais no início do estudo, o número de machos férteis, o número de fêmeas grávidas, os diversos tipos de alterações, e a percentagem de animais apresentando cada tipo de alteração.

Se possível, os resultados numéricos deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá também incluir as seguintes informações:

- espécie/estirpe utilizada,
- resposta tóxica por sexo e por dose, incluindo fertilidade, gestação e viabilidade,
- momento da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no fim do estudo,
- quadro apresentando os pesos de cada ninhada, o peso médio das crias e os pesos individuais das crias no fim do estudo,
- efeito tóxico ou outro sobre a reprodução, a descendência e o crescimento pós-natal,
- dia da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução subsequente,
- peso corporal dos animais P e F₁ seleccionados para o acasalamento,
- resultado da autópsia,
- descrição pormenorizada das observações microscópicas,
- tratamento estatístico dos resultados se necessário,
- discussão dos resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

B. 36
TOXICOCINÉTICA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Administra-se a substância a testar pela via apropriada. Consoante o objectivo do estudo, pode administrar-se a substância em dose única ou repetida, durante períodos de tempo determinados a um ou vários grupos de animais de experiência. Em seguida e, dependendo do tipo de estudo, determinam-se os níveis da substância e/ou seus metabolitos nos líquidos orgânicos, tecidos e/ou excreta.

Os estudos podem ser efectuados com formas «marcadas» ou «não marcadas» da substância a testar. No caso de utilização de um marcador, a posição deste na substância deve fornecer o máximo de informação sobre o destino do composto.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Aclimatizam-se às condições do laboratório jovens animais adultos e saudáveis, durante pelo menos cinco dias antes da experiência. Antes de começar o ensaio, distribuem-se os animais ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento. Em certas condições especiais podem utilizar-se animais muito jovens, fêmeas grávidas ou animais pré-tratados.

Condições experimentais

Animais de experiência

Os estudos toxicocinéticos podem ser efectuados numa ou várias espécies de animais apropriadas e deverão ter em conta as espécies já utilizadas ou que se preveja utilizar noutros estudos toxicológicos sobre a mesma substância a testar. Quando se utilizam roedores num ensaio, a variação de peso entre os animais não deve exceder $\pm 20\%$ do peso médio.

Número e sexo

Para os estudos de absorção e de excreção deverão utilizar-se grupos de quatro animais para cada dose. A escolha de um sexo determinado não é obrigatória mas, nalguns casos, pode tornar-se necessário estudar animais de ambos os sexos. No caso de haver respostas diferentes consoante o sexo serão tratados quatro animais de cada sexo. No caso de estudos com não roedores pode utilizar-se um menor número de animais.

Quando se estudar a distribuição nos tecidos, para calcular a dimensão inicial do grupo, deverá ter-se em conta o número de animais a sacrificar nas datas de exame pré-estabelecidas, bem como o número de exames.

Para o estudo do metabolismo, a dimensão do grupo tratado será adaptada às necessidades do estudo. Para os estudos com doses repetidas e com vários exames intermédios, deverá ter-se em conta, para calcular a dimensão do grupo tratado, o número de exames e o de sacrifícios previstos; no entanto, não pode ser inferior a dois animais.

A dimensão do grupo deverá ser suficiente para permitir uma avaliação aceitável do aumento dos níveis, planalto e da diminuição dos níveis (se for caso disso) da substância a testar e/ou metabolitos.

Doses

Na caso de administração única devem utilizar-se pelo menos duas doses diferentes. Deve haver um dose baixa com a qual não se observem efeitos tóxicos e uma dose elevada susceptível de modificar os parâmetros toxicinéticos ou com a qual se observem efeitos tóxicos.

No caso de administração repetida, a dose baixa é habitualmente suficiente mas, nalgumas circunstâncias, pode ser também necessária uma dose elevada.

Via de administração

Os estudos toxicinéticos serão efectuados usando a mesma via e, quando apropriado, o mesmo veículo já utilizado ou que se preveja utilizar noutros estudos de toxicidade. A substância a testar é habitualmente administrada por via oral (por *gavage* ou incorporação na alimentação) por aplicação na pele ou por inalação durante períodos de tempo determinados, a vários grupos de animais de experiência. A administração da substância a testar por via endovenosa pode ser útil para determinar a absorção relativa pelas outras vias. Além disso, podem obter-se informações úteis sobre o modo de distribuição da substância logo após a sua administração endovenosa.

A possibilidade duma interferência do veículo com a substância a testar deverá ser tomada em consideração. Deve prestar-se atenção particular às diferenças de absorção, quando a substância a testar for administrada por *gavage* ou na alimentação e à necessidade de determinar a dose com precisão quando a substância a testar for incorporada na alimentação.

Período de observação

Todos os animais devem ser observados diariamente registando-se os sinais de toxicidade e outras manifestações clínicas relevantes, incluindo o momento do aparecimento, sua gravidade e duração.

Procedimento

Depois de pesar os animais de experiência, administra-se a substância a testar por uma via apropriada. Se se considerar necessário, os animais poderão estar em jejum antes da administração da substância a testar.

Absorção

A taxa e o grau de absorção da substância administrada podem ser avaliadas por diferentes métodos, em presença e na ausência, de grupos de referência ⁽¹⁾, por exemplo:

- determinação da quantidade da substância testada e/ou dos seus metabolitos nos excreta tais como urina, bñlis, fezes, ar expirado e no conteúdo da carcaça,
- comparação da resposta biológica (por exemplo, estudo da toxicidade aguda) obtida, nos grupos de experiência, nos grupos de controlo e/ou nos grupos de referência,
- comparação da quantidade de substância e/ou de metabolitos excretados pelos rins nos grupos de experiência e nos de referência,
- determinação da área sob a curva nível plasmático/tempo da substância a testar e/ou dos seus metabolitos e comparação com os resultados obtidos num grupo de referência.

⁽¹⁾ Neste método entende-se por grupo de referência um grupo em que a substância a testar é administrada por outra via que assegure uma disponibilidade total de dose.

Distribuição

Existem actualmente duas abordagens à análise do(s) modo(s) de distribuição, podendo utilizar-se um deles ou ambos:

- as técnicas de autoradiografia de corpo inteiro fornecem informações qualitativas úteis,
- o sacrifício dos animais a intervalos diferentes depois da exposição e a determinação da concentração e da quantidade de substância a testar e/ou dos seus metabolitos nos tecidos e nos órgãos fornecem informações quantitativas.

Excreção

Nos estudos de excreção, recolhem-se a urina, as fezes, o ar expirado e, nalguns casos, a bilis. A quantidade da substância a testar e/ou de metabolitos presentes nestes excreta será medida várias vezes depois da exposição, até que cerca de 95 % da dose administrada tenha sido eliminada, ou durante sete dias consecutivos, se não se tiver atingido antes aquela percentagem.

Nalguns casos pode ser necessário considerar a quantidade de substância a testar eliminada no leite dos animais de experiência que estão a aleitar.

Metabolismo

Para determinar a via metabólica e a sua extensão serão analisadas amostras biológicas com métodos adequados. Serão estudadas as estruturas dos metabolitos e propostas vias metabólicas apropriadas quando houver necessidade de responder a questões levantadas em estudos toxicológicos anteriores. Pode ser útil a realização de estudos *in vitro* para obter informações sobre as vias metabólicas.

Podem obter-se informações complementares sobre a relação entre o metabolismo e a toxicidade com estudos bioquímicos tais como a determinação dos efeitos sobre sistemas de enzimas metabolizantes, da depleção em compostos endógenos com grupos sulfidrilos não proteicos, e da ligação às macromoléculas.

2. RESULTADOS

Consoante o tipo de estudo efectuado, os resultados serão resumidos em quadros, acompanhados por gráficos quando tal for apropriado. Serão indicados para cada grupo de experiência as variações médias e estatísticas das medições em função do tempo, das doses, dos tecidos e dos órgãos, quando apropriado. O grau de absorção bem como as quantidades excretadas e o ritmo de excreção serão determinados por métodos apropriados. Quando forem efectuados estudos de metabolismo, será indicada a estrutura dos metabolitos identificados e serão apresentadas as possíveis vias metabólicas.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

Segundo o tipo de estudo efectuado, o relatório do ensaio deverá conter as seguintes informações:

- espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar,
- caracterização dos produtos marcados, se utilizados,
- doses e intervalos usados,
- via(s) de administração e qualquer veículo utilizado,
- efeitos tóxicos e outros observados,
- métodos de determinação da substância testada e/ou metabolitos nas amostras biológicas incluindo o ar expirado,
- apresentação em quadros das medidas efectuadas por sexo, dose, regime, tempo, tecidos e órgãos,

- indicação do grau de absorção e de excreção em função do tempo,
- métodos de caracterização e identificação dos metabolitos nas amostras biológicas,
- métodos utilizados para as medições bioquímicas relacionadas com o metabolismo,
- vias de metabolismo propostas,
- discussão de resultados,
- interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

B.37 NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR EXPOSIÇÃO AGUDA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Na determinação e avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias deve ter-se em conta o potencial de certos grupos, de determinarem tipos específicos de neurotoxicidade não detectáveis noutros ensaios de toxicidade. Verifica-se, assim, que algumas substâncias organofosforadas induzem neurotoxicidade retardada, constituindo potenciais alvos para avaliação.

Os ensaios de rastreio *in vitro* podem ser utilizados para identificar substâncias susceptíveis de induzir polineuropatias retardadas; todavia, a obtenção de resultados negativos nos ensaios *in vitro* não comprova que as referidas substâncias não possuem efeitos neurotóxicos.

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.2. Definições

As substâncias organofosforadas incluem os ésteres, tioésteres e anidridos não ionizados de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos e organofosforamídicos ou de ácidos fosforotióicos, fosfonotióicos e fosforotioamídicos afins, bem como quaisquer outras substâncias que possam causar o tipo de neurotoxicidade retardada que se observa por vezes nas referidas classes de substâncias.

Neurotoxicidade retardada é o síndrome associado à manifestação retardada de ataxia e de axonopatias distais na espinal medula e nos nervos periféricos, bem como à inibição e à redução da actividade da esterase envolvida na neuropatia, presente no tecido nervoso.

1.3. Substâncias de referência

Pode utilizar-se uma substância de referência com um lote de controlo positivo, de modo a demonstrar que, nas condições de ensaio, não existe uma alteração significativa da reacção da espécie em causa.

O fosfato de tris-*o*-tolilo [nº CAS: 78-30-8; nº EINECS: 201-103-5; designado éster tris (2-metilfenílico) do ácido fosfórico na nomenclatura CAS e também conhecido por fosfato de tris-*o*-cresilo] constitui uma substância neurotóxica largamente utilizada.

1.4. Princípio do método de ensaio

A substância em estudo é administrada por via oral, numa única dose, a galinhas domésticas eventualmente protegidas de efeitos colinérgicos agudos. Os animais são observados durante 21 dias, registando-se a manifestação de quaisquer perturbações do comportamento, bem como de ataxia e paralisia. As determinações bioquímicas, nomeadamente da inibição da esterase envolvida na neuropatia, são efectuadas com aves seleccionadas de modo aleatório em cada lote, em geral 24 e 48 horas após a administração. 21 dias após a exposição, procede-se ao abate dos restantes animais, seguido do exame histopatológico de determinados tecidos do sistema nervoso.

1.5. Descrição do método

1.5.1. Preparação

Seleccionam-se de modo aleatório galinhas adultas, jovens e saudáveis, isentas de afecções virais e medicação concomitantes, bem como de anomalias da marcha, que se repartem pelos lotes de ensaio e de controlo. Os animais são aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes do início do ensaio. Devem utilizar-se gaiolas ou recintos cujas dimensões permitam a livre mobilidade das aves e a fácil observação da respectiva marcha.

A substância em estudo é administrada por via oral, por intermédio de uma sonda

gástrica, de cápsulas de gelatina ou de um método comparável. Os líquidos podem ser administrados sem diluição ou dissolvidos num veículo adequado, nomeadamente óleo de milho; os sólidos devem ser dissolvidos sempre que possível, uma vez que a absorção de doses elevadas de sólidos dispersos em cápsulas de gelatina poderá não ser eficaz. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se, ou determinar-se antes do ensaio, as respectivas características de toxicidade.

1.5.2. Condições de ensaio

1.5.2.1. Animais de ensaio

Recomenda-se a utilização de galinhas poedeiras, adultas e jovens (*Gallus gallus domesticus*), com idades compreendidas entre 8 e 12 meses. Devem utilizar-se raças e variedades correntes, mantendo-se os animais em condições que permitam a sua livre mobilidade.

1.5.2.2. Número e sexo

Além do lote de ensaio, devem utilizar-se um lote de controlo com o veículo e um lote de controlo positivo. Os animais incluídos no lote de controlo com o veículo devem ser tratados de modo análogo aos animais do lote de ensaio, omitindo-se apenas a administração da substância em estudo.

Deve utilizar-se um número suficiente de animais em cada lote, de modo a que possam ser abatidos pelo menos seis animais para as determinações bioquímicas (três em dois momentos diferentes), sobrevivendo seis para o período de observação de 21 dias.

Pode efectuar-se um controlo positivo em paralelo ou, como alternativa, utilizar dados obtidos em controlos positivos anteriores. O lote de controlo positivo deve ser constituído por um mínimo de seis aves a que se administra uma substância com actividade neurotóxica retardada conhecida, destinando-se três animais às determinações bioquímicas e os restantes a observação. Recomenda-se a actualização periódica dos dados obtidos. Caso um laboratório altere algum elemento essencial do protocolo experimental (por exemplo, variedade de animais utilizada, condições de alimentação ou alojamento), deve efectuar-se novo controlo positivo.

1.5.2.3. Doses

Para estabelecer a dose a utilizar no ensaio, deve realizar-se um estudo prévio com um número adequado de aves e de doses, que poderá implicar a morte de alguns animais. Todavia, de modo a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, pode utilizar-se atropina ou outro agente protector que se saiba não interferir com as reacções neurotóxicas retardadas. Na estimativa da dose máxima não letal da substância em estudo podem utilizar-se diversos métodos de ensaio (ver o método B.1bis).

A dose de substância em estudo a utilizar no ensaio deve ser tão elevada quanto possível, em função dos resultados do estudo prévio de selecção, não excedendo 2 000 mg/kg de massa corporal. O número de animais mortos durante o ensaio não deve interferir com o número mínimo de animais a utilizar para as determinações bioquímicas e para o exame histopatológico a 21 dias (seis em ambos os casos). De modo a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, pode utilizar-se atropina ou outro agente protector que se saiba não interferir com as reacções neurotóxicas retardadas.

1.5.2.4. Ensaio-limite

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 2 000 mg/kg de massa corporal e dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se preveja o surgimento de efeitos tóxicos, poderá não ser

necessário efectuar um ensaio com uma dose mais elevada. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5.2.5. Período de observação

O período de observação deve ser de 21 dias.

1.5.3. Procedimento

Após a administração de um agente destinado a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, administra-se a substância em estudo numa única dose.

1.5.3.1. Observações gerais

Devem iniciar-se as observações logo após a administração da substância. Os animais devem ser cuidadosamente observados várias vezes nos dois dias subsequentes à administração e pelo menos diariamente até perfazer o período de 21 dias ou até ao abate previsto. Devem registar-se todos os sinais de toxicidade, incluindo o momento da manifestação, o tipo, a gravidade e a duração das anomalias de comportamento. A ataxia deve determinar-se de acordo com uma escala numérica constituída por um mínimo de quatro níveis, devendo também registar-se os casos de paralisia. Pelo menos duas vezes por semana, devem retirar-se das gaiolas os animais seleccionados para observação patológica, submetendo-os a um período de actividade motora forçada, nomeadamente a subida de uma escada, de modo a facilitar a observação de efeitos tóxicos mínimos. Os animais moribundos, bem como aqueles que mostrem sinais de dor e sofrimento intensos, devem ser removidos, abatidos por intervenção humana e autopsiados.

1.5.3.2. Massa corporal

As aves devem ser pesadas imediatamente antes da administração da substância em estudo e, pelo menos, uma vez por semana na sequência da mesma.

1.5.3.3. Determinações bioquímicas

Alguns dias após a administração da substância, devem abater-se seis aves seleccionadas de modo aleatório dos lotes de ensaio e de controlo com o veículo, bem como três aves do lote de controlo positivo (caso este último seja efectuado em paralelo), preparando-se os respectivos cérebros e espinais medulas com vista a determinar a inibição da actividade da esterase envolvida na neuropatia. Além disso, pode também revelar-se útil preparar, para o mesmo fim, tecidos provenientes dos nervos ciáticos. Em geral, abatem-se três animais do lote de controlo e de cada lote de ensaio 24 horas após a administração da substância e três 48 horas após a mesma; os três animais dos lotes de controlo positivos devem ser abatidos 24 horas após a administração. Caso os sinais clínicos de intoxicação (que pode ser avaliada em função do momento da manifestação dos efeitos colinérgicos) observados indicarem que o agente tóxico é eliminado de forma bastante lenta, poderá ser preferível recolher tecidos de três animais em dois momentos compreendidos entre 24 horas e, no máximo, 72 horas após a administração.

Se for caso disso, podem também efectuar-se determinações de acetilcolinesterase com as amostras em causa. Todavia, a possível ocorrência in vivo de reactivação espontânea da mesma poderá levar a subestimar a capacidade de inibição da acetilcolinesterase da substância em estudo.

1.5.3.4. Autópsia

A autópsia dos animais abatidos (abates previstos e abates de animais moribundos) deve incluir o exame macroscópico do cérebro e da espinal medula.

1.5.3.5. Exame histopatológico

O tecido nervoso dos animais sobreviventes após o período de observação, que não for utilizado para as determinações bioquímicas deve ser objecto de exame

microscópico. Os tecidos devem ser fixados in situ, por recurso a técnicas de perfusão. As secções a examinar incluem o cerebelo (ao nível meio-longitudinal), a medulla oblongata, a espinal medula e os nervos periféricos. Devem recolher-se secções da espinal medula provenientes do segmento cervical superior e das regiões médio-torácica e lombo-sagrada. Devem também recolher-se secções provenientes da região distal do nervo tibial e das respectivas ramificações para o músculo gastrocnémio, bem como do nervo ciático. As secções em causa devem ser coradas com corantes adequados à mielina e corantes específicos dos axónios.

2. DADOS

A obtenção de resultados negativos para os parâmetros bioquímicos, histopatológicos e de comportamento investigados no âmbito do presente ensaio não implica, de modo geral, a realização de ensaios complementares de neurotoxicidade retardada. A obtenção de resultados duvidosos ou não conclusivos poderá requerer a realização de estudos complementares.

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentam lesões e alterações de comportamento ou dos parâmetros bioquímicos, bem como o tipo e a gravidade das referidas lesões, e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões e alterações, em função da respectiva gravidade.

Os resultados do ensaio devem ser avaliados em termos de incidência, gravidade e correlação das alterações de comportamento, bem como dos efeitos bioquímicos, histopatológicos e outros efeitos observados nos lotes de ensaio e de controlo.

Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por recurso a um método estatístico de aceitação geral, cuja escolha deve ser efectuada na fase de concepção do ensaio.

3. RELATÓRIO

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir, sempre que possível, as seguintes informações:

Animais utilizados no ensaio:

- estirpe utilizada;
- número e idade dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, etc.;
- massa de cada animal no início do ensaio.

Condições de ensaio:

- pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à respectiva estabilidade e homogeneidade, se for caso disso;
- justificação da escolha do veículo;
- pormenores relativos à administração da substância em estudo;
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;
- motivo da selecção da dose utilizada;
- especificação das doses administradas, incluindo pormenores relativos ao veículo, bem como ao volume utilizado e às características físicas da substância administrada;
- identidade do agente protector eventualmente utilizado e pormenores relativos à respectiva administração.

Resultados:

- dados relativos à massa corporal;
- consumo de alimentos e de água, se for caso disso;
- reacções tóxicas observadas em cada lote, incluindo a mortalidade;
- natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);

- descrição pormenorizada dos ensaios bioquímicos realizados e respectivos resultados;
- dados obtidos por autópsia;
- descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico;
- tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. REFERÊNCIAS

O presente método é análogo ao método OCDE TG 418.

B.38 NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRAÇÃO REPETIDA A 28 DIAS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Na determinação e avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias deve ter-se em conta o potencial de certas classes das mesmas de determinarem tipos específicos de neurotoxicidade não detectáveis noutros ensaios de toxicidade. Verifica-se, assim, que algumas substâncias organofosforadas induzem neurotoxicidade retardada, constituindo potenciais alvos para avaliação.

Os ensaios de rastreio in vitro podem ser utilizados para identificar substâncias susceptíveis de induzir polineuropatias retardadas; todavia, a obtenção de resultados negativos nos ensaios in vitro não comprova que as referidas substâncias não possuem efeitos neurotóxicos.

O presente ensaio de toxicidade retardada a 28 dias fornece informações sobre os eventuais riscos para a saúde decorrentes da exposição repetida num período limitado, nomeadamente a relação dose administrada-efeito, bem como uma estimativa das doses sem efeitos observados, a utilizar no estabelecimento de critérios de segurança na exposição à substância.

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.2. Definições

As substâncias organofosforadas incluem os ésteres, tioésteres e anidridos não ionizados de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos e organofosforamídicos ou de ácidos fosforotióicos, fosfonotióicos e fosforotioamídicos afins, bem como quaisquer outras substâncias que possam causar o tipo de neurotoxicidade retardada que se observa por vezes nas referidas classes de substâncias.

Neurotoxicidade retardada é o síndrome associado à manifestação retardada de ataxia e de axonopatias distais na espinal medula e nos nervos periféricos, bem como à inibição e à redução da actividade da esterase envolvida na neuropatia, presente no tecido nervoso.

1.3. Princípio do método de ensaio

A substância em estudo é administrada por via oral a galinhas domésticas, durante 28 dias. Os animais são observados pelo menos diariamente, registando-se a manifestação de quaisquer perturbações do comportamento, bem como de ataxia e paralisia, até 14 dias após a administração da última dose. As determinações bioquímicas, nomeadamente da inibição da esterase envolvida na neuropatia, são efectuadas com aves seleccionadas de modo aleatório em cada lote, em geral 24 e 48 horas após a administração da última dose. Duas semanas após esta última, procede-se ao abate dos restantes animais, seguido do exame histopatológico de determinados tecidos do sistema nervoso.

1.4. Descrição do método

1.4.1. Preparação

Seleccionam-se de modo aleatório galinhas adultas, jovens e saudáveis, isentas de afecções virais e medicação concomitantes, bem como de anomalias da marcha, que se repartem pelos lotes de ensaio e de controlo. Os animais são aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes do início do ensaio.

Devem utilizar-se gaiolas ou recintos cujas dimensões permitam a livre mobilidade das aves e a fácil observação da respectiva marcha.

A substância em estudo é administrada por via oral, por intermédio de uma sonda gástrica, de cápsulas de gelatina ou de um método comparável. Os líquidos podem ser administrados sem diluição ou dissolvidos num veículo adequado, nomeadamente óleo de milho; os sólidos devem ser dissolvidos sempre que possível, uma vez que a absorção de doses elevadas de sólidos dispersos em cápsulas de gelatina poderá não ser eficaz. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se, ou determinar-se antes do ensaio, as respectivas características de toxicidade.

1.4.2. Condições de ensaio

1.4.2.1. Animais de ensaio

Recomenda-se a utilização de galinhas poedeiras, adultas e jovens (*Gallus gallus domesticus*), com idade compreendida entre 8 e 12 meses. Devem utilizar-se raças e variedades correntes, mantendo-se os animais em condições que permitam a sua livre mobilidade.

1.4.2.2. Número e sexo

Devem utilizar-se pelo menos três lotes de ensaio e um lote de controlo com o veículo. Os animais incluídos no lote de controlo com o veículo devem ser tratados de modo análogo aos animais do lote de ensaio, omitindo-se apenas a administração da substância em estudo. Deve utilizar-se um número suficiente de animais em cada lote, de modo a que possam ser abatidos pelo menos seis animais para as determinações bioquímicas (três em dois momentos diferentes), sobrevivendo seis para o período de observação de 14 dias após a administração da última dose.

1.4.2.3. Doses

Na selecção das doses devem ter-se em conta os resultados dos ensaios de neurotoxicidade retardada por administração aguda, bem como quaisquer outros dados disponíveis em matéria de toxicidade e cinética referentes à substância em causa. A dose mais elevada deve ser escolhida com o objectivo de induzir efeitos tóxicos, nomeadamente de neurotoxicidade retardada, evitando contudo a morte e o sofrimento intenso. Posteriormente, deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos nocivos associados à administração da dose mais reduzida.

1.4.2.4. Ensaio-limite

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de massa corporal e dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se preveja a manifestação de efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio com uma dose mais elevada. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.4.2.5. Período de observação

Os animais devem ser observados com uma frequência pelo menos diária no decurso do período de exposição e nos 14 dias subsequentes à administração da última dose, salvo no caso de se proceder a autópsias intermédias.

1.4.3. Procedimento

Deve administrar-se a substância aos animais sete dias por semana, num período de 28 dias.

1.4.3.1. Observações gerais

Devem iniciar-se as observações logo após a administração da primeira dose. Os animais devem ser cuidadosamente observados com uma frequência diária mínima, no decurso do período de exposição e nos 14 dias subsequentes à administração da última dose, ou até ao abate previsto. As observações devem incluir, nomeadamente, as anomalias de comportamento. A ataxia deve determinar-se de acordo com uma escala numérica constituída por um mínimo de quatro níveis, devendo também registar-se os casos de paralisia. Pelo menos duas vezes por semana, devem retirar-se das gaiolas os animais seleccionados para observação patológica, submetendo-os a um período de actividade motora forçada, nomeadamente a subida de uma escada, de modo a facilitar a observação de efeitos tóxicos mínimos. Os animais moribundos, bem como aqueles que mostrem sinais de dor e sofrimento intensos, devem ser removidos, abatidos por intervenção humana e autopsiados.

1.4.3.2. Massa corporal

As aves devem ser pesadas imediatamente antes da administração da primeira dose e, pelo menos, uma vez por semana na sequência da mesma.

1.4.3.3. Determinações bioquímicas

Alguns dias após a administração da última dose, devem abater-se seis aves seleccionadas de

modo aleatório dos lotes de ensaio e de controlo com o veículo, preparando-se os respectivos cérebros e espinais medulas com vista a determinar a inibição da actividade da esterase envolvida na neuropatia. Além disso, pode também revelar-se útil preparar, para o mesmo fim, tecidos provenientes dos nervos ciáticos. Em geral, abatem-se três animais do lote de controlo e de cada lote de ensaio 24 horas após a administração da última dose e três 48 horas após a mesma. Podem utilizar-se outros intervalos de abate, apresentando a respectiva justificação, caso os dados provenientes de ensaios de toxicidade aguda ou de outro tipo de estudos (nomeadamente de toxicocinética) mostrem que esses intervalos são mais adequados. Se for caso disso, podem também efectuar-se determinações de acetilcolinesterase com as amostras em causa. Todavia, a possível ocorrência in vivo de reactivação espontânea da mesma poderá levar a subestimar a capacidade de inibição da acetilcolinesterase da substância em estudo.

1.4.3.4. Autópsia

A autópsia dos animais abatidos (abates previstos e abates de animais moribundos) deve incluir o exame macroscópico do cérebro e da espinal medula.

1.4.3.5. Exame histopatológico

O tecido nervoso dos animais sobreviventes após o período de observação que não for utilizado para as determinações bioquímicas deve ser objecto de exame microscópico. Os tecidos devem ser fixados in situ, por recurso a técnicas de perfusão. As secções a examinar incluem o cerebelo (ao nível meio-longitudinal), a medulla oblongata, a espinal medula e os nervos periféricos. Devem recolher-se secções da espinal medula provenientes do segmento cervical superior e das regiões medio-torácica e lombo-sagrada. Devem também recolher-se secções provenientes da região distal do nervo tibial e das respectivas ramificações para o músculo gastrocnémio, bem como do nervo ciático. As secções em causa devem ser coradas com corantes adequados à mielina e corantes específicos dos axónios. Inicialmente, o exame microscópico deve abranger apenas os tecidos conservados dos animais do lote de controlo e do lote a que foi administrada a dose mais elevada; se, neste último caso, se observarem efeitos tóxicos, deve efectuar-se também o exame microscópico dos tecidos provenientes dos animais dos lotes a que foram administradas doses reduzidas e intermédias.

2. DADOS

A obtenção de resultados negativos para os parâmetros bioquímicos, histopatológicos e de comportamento investigados no âmbito do presente ensaio não implica, de modo geral, a realização de ensaios complementares de neurotoxicidade retardada. A obtenção de resultados duvidosos ou não conclusivos poderá requerer a realização de estudos complementares. Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentam lesões e alterações de comportamento ou dos parâmetros bioquímicos, bem como o tipo e a gravidade das referidas lesões, e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões e alterações, em função da respectiva gravidade. Os resultados do ensaio devem ser avaliados em termos de incidência, gravidade e correlação das alterações de comportamento, bem como dos efeitos bioquímicos, histopatológicos e outros efeitos observados nos lotes de ensaio e de controlo.

Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por recurso a um método estatístico de aceitação geral, cuja escolha deve ser efectuada na fase de concepção do ensaio.

3. RELATÓRIO

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir, sempre que possível, as seguintes informações:

Animais utilizados no ensaio:

- estirpe utilizada;
- número e idade dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, etc.;

- massa de cada animal no início do ensaio.

Condições de ensaio:

- pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à respectiva estabilidade e homogeneidade, se for caso disso;
- justificação da escolha do veículo;
- pormenores relativos à administração da substância em estudo;
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;
- motivo da selecção das doses utilizadas;
- especificação das doses administradas, incluindo pormenores relativos ao veículo, bem como ao volume utilizado e às características físicas da substância administrada;
- motivos da selecção de outros intervalos para as determinações bioquímicas que não 24 ou 48 horas após a administração da última dose.

Resultados:

- dados relativos à massa corporal;
- reacções tóxicas observadas por dose administrada, incluindo a mortalidade;
- nível sem efeitos adversos observáveis;
- natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);
- descrição pormenorizada dos ensaios bioquímicos realizados e respectivos resultados;
- dados obtidos por autópsia;
- descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico;
- tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. REFERÊNCIAS

O presente método é análogo ao método OCDE TG 419

B.39. ENSAIO *IN VIVO* DA SÍNTESE NÃO-PROGRAMADA (UDS) DE ADN EM CÉLULAS

DO FÍGADO DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 486 - Ensaio *in vivo* da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do ensaio *in vivo* da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos é identificar as substâncias que induzem a reparação do ADN nas células do fígado de animais expostos à substância em estudo (ver 1,2,3,4).

O presente ensaio *in-vivo* apresenta um método para investigação dos efeitos dos produtos químicos genotóxicos sobre o fígado. O valor-limite medido é indicativo dos danos e da subsequente reparação do ADN em células do fígado. O fígado é geralmente o local principal de metabolização dos compostos absorvidos, pelo que é particularmente apropriado para avaliar os danos do ADN *in vivo*.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

O ponto final da síntese não programada (UDS) de ADN é medido através da determinação da incorporação de nucleótidos marcados por células que não se encontram numa fase de síntese programada de ADN (Fase S). A técnica mais utilizada é a determinação da incorporação de timidina marcada com trítio (³H-TdR) por autoradiografia. Nos ensaios UDS *in-vivo* são geralmente utilizados fígados de rato. Podem também ser utilizados outros tecidos, mas não é esse o objectivo do presente método.

A detecção de uma resposta UDS depende do número de bases do ADN excizadas e substituídas no local danificado. Por conseguinte, o ensaio UDS é particularmente válido para a detecção de “reparação de cadeias longas” (20-30 bases) induzida pela substância. A “reparação de cadeias curtas” (1-3 bases) é, pelo contrário, detectada com uma sensibilidade muito mais baixa. Além disso, podem existir eventos mutagénicos decorrentes da não-reparação, reparação incorrecta ou de problemas de replicação das lesões do ADN. A extensão da resposta UDS não dá qualquer indicação em relação à fidelidade do processo de reparação. Além disso, é possível que um agente mutagénico reaja com o ADN mas que os danos do ADN não sejam posteriormente reparados através de um processo de reparação da excisão. A ausência de informação específica sobre a actividade mutagénica do ensaio UDS é compensada pela potencial sensibilidade do seu ponto final, uma vez que é medido na totalidade do genoma.

Ver também a Parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Células em reparação: apresentam uma granulação nuclear líquida (NNG) superior a um valor pré-determinado, a justificar pelo laboratório que conduz o ensaio.

Granulação nuclear líquida (NNG): medida quantitativa da actividade celular UDS em ensaios autoradiográficos UDS, calculada pela subtracção do número médio de grânulos citoplásmicos em sectores citoplásmicos equivalentes ao núcleo (CG) ao número de grânulos nucleares (NG): $NNG = NG - CG$. As contagens NNG são calculadas para cada célula e são depois ponderadas para as células de uma cultura, em culturas paralelas, etc.

Síntese não programada (UDS) de ADN: síntese de reparação do ADN após excisão e remoção de uma sequência de ADN que contém uma região danificada por indução de substâncias químicas ou de agentes físicos.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O ensaio UDS *in vivo* em células do fígado de mamíferos indica a ocorrência de uma síntese de reparação do ADN após excisão e remoção de uma sequência de ADN que continha uma região danificada por indução de substâncias químicas ou de agentes físicos. O ensaio baseia-se geralmente na incorporação de ³H-TdR no ADN de células do fígado com uma baixa proporção de células na Fase-S do ciclo celular. A incorporação de ³H-TdR é geralmente determinada por autoradiografia, uma vez que esta técnica não é tão sensível à interferência das células em Fase-S como, por exemplo, a contagem de cintilação em meio líquido.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Seleção das espécies animais*

Geralmente são utilizados ratos, embora possam ser utilizada qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder $\pm 20\%$ do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, Parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50-60%.

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o estudo.

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do Ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/Veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, não devendo produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solventes/veículos aquosos.

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo). Com exceção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem ser substâncias comprovadamente causadoras de UDS quando administradas aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. Os controlos positivos que exijam ativação metabólica devem ser utilizados em doses que desencadeiem uma resposta moderada (4). A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Tempo de amostragem	Substância	Nº CAS	Nº EINECS
Amostragens iniciais (2-4 horas)	N-Nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Amostragens finais (12-16 horas)	N-2-Fluorenilacetamida (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Podem ser utilizadas outras substâncias de controlo positivo apropriadas. O controlo positivo pode ser administrado por uma via diferente da substância em estudo.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Número e sexo de animais**

Deve ser utilizado um número de animais suficiente para que a variação biológica natural seja tomada em consideração nos resultados do ensaio, com pelo menos 3 animais analisáveis por grupo. Se já existir uma base de dados históricos significativa, os grupos de controlo positivo e negativo poderão conter apenas 1 ou 2 animais.

Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial de toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo, de preferência o sexo masculino. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2. **Programação do tratamento**

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa única exposição

1.5.3. **Doses**

Normalmente, são utilizadas pelo menos duas doses diferentes. A dose mais elevada é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. Em termos gerais, a dose inferior deve ser de 25-50% da dose mais elevada.

As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não-tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas numa base casuística. Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal.

A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade no fígado (p.ex.: núcleos picnóticos).

1.5.4. **Ensaio limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração, mas a via intraperitoneal não é recomendada, uma vez que poderá expor o fígado à substância em estudo directamente e não através do sistema circulatório. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injeção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante para todas as doses a administrar.

1.5.6. **Preparação das células de fígado**

As células do fígado são normalmente preparadas a partir dos animais expostos à substância em estudo 12-16 horas após a administração da substância em estudo. Geralmente será necessário realizar uma primeira amostra (normalmente 2-4 horas após a exposição), que só não terá de ser utilizada quando haja uma resposta positiva clara às 12-16 horas. Contudo, podem ser utilizados outros tempos de amostragem, desde que sejam justificados com base em dados toxicocinéticos.

As culturas celulares de curta duração do fígado de mamíferos são geralmente preparadas irrigando o fígado *in situ* com colagenase e deixando que algumas células livres separadas do fígado há pouco tempo se fixem a uma superfície apropriada. As células do fígado de animais do controlo negativo devem ter uma viabilidade de pelo menos 50% (5).

1.5.7. **Determinação da UDS**

As células de fígado de mamífero isoladas há pouco tempo são geralmente incubadas num meio que contém ^3H -TdR durante um período adequado, por exemplo 3-8 horas. No final do período de incubação, as células são lavadas para remover o meio residual e depois incubadas num meio com excesso de timidina não rotulada para diminuir a radioactividade não incorporada ("lavagem a frio"). As células são então enxaguadas, fixadas e secas. Para os tempos de incubação mais prolongados, pode não ser necessária a lavagem a frio. As lâminas são mergulhadas na emulsão autoradiográfica, expostas na obscuridade (ou seja, refrigeradas durante 7-14 dias), reveladas e coradas, após o que se procede à contagem dos grânulos de prata expostos. Devem ser preparadas duas ou três lâminas de cada animal.

1.5.8. **Análise**

As preparações devem conter um número suficiente de células com morfologia normal para permitir uma avaliação significativa da UDS. As preparações são examinadas microscopicamente para sinais de citotoxicidade evidente (por exemplo picnose, níveis diminuídos de radiação proveniente da timina rotulada).

As lâminas devem ser codificadas antes da contagem dos grânulos. Normalmente são contadas 100 células de cada animal, de pelo menos duas lâminas; se forem contadas menos de 100 células/animal, deve ser fornecida uma justificação. As contagens dos grânulos dos núcleos em Fase-S não são tomadas em consideração, mas a proporção de células em Fase-S pode ser registada.

O grau de incorporação da $^3\text{H-TdR}$ nos núcleos e citoplasma das células morfológicamente normais, evidenciado pelo depósito de grânulos de prata, deve ser determinado por métodos apropriados.

As contagens de grânulos são determinadas nos núcleos (grânulos nucleares, NG) e em sectores do citoplasma equivalentes ao núcleo (grânulos citoplásmicos, CG). As contagens de CG são feitas no sector do citoplasma mais rotulado ou fazendo a média de dois ou três locais com grânulos citoplásmicos escolhidos aleatoriamente junto à região do núcleo. Outros métodos de contagem (p.ex.: contagem de células inteiras) podem ser utilizados, se se justificarem (6).

2. **DADOS**

2.1. **TRATAMENTO DOS RESULTADOS**

Devem ser apresentados dados relativos a cada lâmina e a cada animal. Para além disso, todos os dados devem ser apresentados sob a forma de um quadro. As contagens da granulação nuclear líquida (NNG) devem ser calculadas para cada célula, para cada animal, para cada dose e para cada tempo de colheita subtraindo as contagens CG das contagens NG. Se forem contadas as “células em reparação”, os critérios para definir essas células devem ser justificados e baseados em dados históricos ou dos controlos negativos realizados em paralelo com o ensaio. Os resultados numéricos podem ser avaliados através de métodos estatísticos. Os métodos estatísticos a utilizar eventualmente devem ser escolhidos e justificados antes da realização do estudo.

2.2. **AValiação E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os exemplos de critérios para a definição de uma resposta como positiva/negativa incluem:

- | | | |
|----------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| positiva | i) | valores de NNG positivos, acima de um limiar pré-definido justificado com base nos dados históricos do laboratório; |
| | ou | ii) valores de NNG significativamente superiores aos do controlo em paralelo. |
| negativa | i) | valores de NNG iguais/inferiores ao limiar de controlo histórico; |
| | ou | ii) valores de NNG não significativamente superiores aos do controlo em paralelo. |

A importância biológica dos dados deve ser considerada, ou seja, devem ser tomados em consideração parâmetros como a variação de animal para animal, a relação dose/resposta e a citotoxicidade. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos, embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio UDS em células do fígado de mamíferos *in vivo* indica que a substância em estudo induz danos no ADN das células do fígado de mamíferos *in vivo* que podem ser reparados por síntese não programada de ADN *in vitro*. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz danos no ADN que sejam detectáveis pelo presente ensaio.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

- justificação para a escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida;

Animais de ensaio:

- espécie/linha celular utilizada;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo;

Condições de ensaio:

- controlos positivos e negativos veículo/solvente;
- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado;
- justificação para a selecção das doses;
- preparação da substância em estudo;
- modo de administração da substância em estudo;
- justificação da via de administração escolhida;
- métodos usados para verificar se o agente em estudo atingiu o sistema circulatório geral, caso tenham sido utilizados;
- conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável;
- qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada dos calendários de tratamento e amostragem;

- métodos de medição da toxicidade;
- método de preparação e cultura das células do fígado;
- técnica de autoradiografia utilizada;
- número de lâminas preparadas e número de células contabilizadas;
- critérios de avaliação;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;

Resultados:

- valores médios das contagens de grânulos nucleares, grânulos citoplásmicos e da granulação nuclear líquida para cada lâmina, animal e grupo;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- sinais de toxicidade;
- dados relativos ao controlos positivos e negativos (solvente/veículo) realizado em paralelo com o ensaio;
- dados históricos relativos ao controlos positivos e negativos (solvente/veículo) realizado em paralelo com o ensaio, com as respectivas gama, valor médio e desvio-padrão;
- número de células “em reparação”, caso tenham sido contabilizadas;
- número de células em Fase-S, caso tenham sido contadas
- viabilidade das células.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, 1-18.
2. Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. *Mutation Res.* 189, 123-133.
3. Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
4. Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, 263-285.
5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). *Mutation Res.*, 291, 21-27.
6. Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen*, 4, 553-562.

B.40. CORROSIVIDADE CUTÂNEA

1. MÉTODO

1.1 INTRODUÇÃO

O Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM, Centro Comum de Investigação, Comissão Europeia) reconheceu a validade científica de dois ensaios *in vitro* para a corrosividade cutânea, o ensaio de resistência eléctrica transcutânea (*transcutaneous electrical resistance* - "TER") em pele de rato e um ensaio com um modelo de pele humana (ECVAM, Centro Comum de Investigação, Comissão Europeia) (1)(2)(3). Os estudos de validação levados a cabo pelo ECVAM demonstraram que ambos os ensaios permitem distinguir de forma fiável as substâncias corrosivas das não corrosivas para a pele. Para além disso, o protocolo do ensaio baseado no modelo de pele humana permitiu distinguir correctamente entre os diferentes graus de efeito corrosivo (R35 - altamente corrosivo, e R34 - corrosivo) (2). Apresentam-se a seguir a descrição e os procedimentos de ambos os ensaios; a escolha do ensaio depende das exigências específicas e das preferências do utilizador.

Ver também a Introdução Geral, Parte B.

1.2 DEFINIÇÕES

Corrosividade cutânea: produção de danos irreversíveis dos tecidos cutâneos no seguimento da aplicação de material de ensaio.

1.3 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma especificada, mas ver pontos 1.5.3.4 e 1.7.2.3.

1.4 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO - ENSAIO "TER" EM PELE DE RATO

O material a testar é aplicado durante um período de até 24 horas sobre a superfície da epiderme de discos de pele de ratos jovens sacrificados sem crueldade. Os materiais corrosivos são identificados pela sua capacidade de causarem uma perda da integridade normal do *stratum corneum* e da função de barreira, perda essa que é medida pela redução do "TER" intrínseco abaixo de um determinado limiar (5 k Ω) (4)(5). Os materiais simplesmente irritantes e os materiais não irritantes não reduzem o "TER" abaixo desse limiar. Para as substâncias tensoactivas e para os compostos orgânicos neutros, pode ainda ser incorporado no ensaio um passo de ligação a um corante (para as definições neste contexto, ver a referência (6)), a fim de reduzir o número de falsos positivos característico dos ensaios deste tipo de substâncias químicas (2)(7).

1.5 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO - ENSAIO "TER" EM PELE DE RATO

1.5.1 Animais

Para a preparação dos discos de pele, são utilizados ratos jovens (20-23 dias) (Wistar ou estirpe comparável). Os pelos dorsais e dos flancos são removidos cuidadosamente, com a ajuda de pequenas tesouras. Os animais são depois lavados e esfregados, devendo a zona da pele que irá ser utilizada ser mergulhada numa solução antibiótica (contendo, por exemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol e anfotericina a concentrações suficientes para inibir o crescimento bacteriano). Os animais são novamente lavados com uma solução antibiótica no terceiro ou no quarto dia após a primeira lavagem, devendo depois ser utilizados num prazo de 3 dias (para a preparação das peles não deverão ser utilizados animais com uma idade superior a 31 dias).

1.5.2 Preparação dos discos de pele

Os animais são sacrificados sem crueldade. A pele dorsal dos animais é depois retirada e a gordura em excesso é removida através de raspagem cuidadosa. A pele é colocada sobre a extremidade de um tubo de PTFE (politetrafluoroetileno), com o cuidado de garantir que a superfície epidérmica esteja em contacto com o tubo. A pele é fixa na extremidade do tubo com uma junta tórica em borracha e elimina-se o tecido em excesso. As dimensões do tubo e da junta tórica são as apresentadas na Figura 1. A junta tórica deve ser envolvida em vaselina, de forma a garantir a estanqueidade da sua união com o tubo de PTFE. O tubo é depois suspenso por uma mola dentro de uma câmara com uma solução de sulfato de magnésio (154 mM) (Figura 2).

1.5.3 Procedimento de ensaio

1.5.3.1 Aplicação do material de ensaio

As substâncias de ensaio líquidas (150 µl) são aplicadas na superfície epidérmica no interior do tubo (Figura 2). Quando a substância de ensaio for sólida, deverá ser aplicada uma quantidade suficiente para garantir a cobertura de toda a superfície epidérmica. Por cima dessa substância é depois acrescentada água desionizada (150 µl) e os tubos são ligeiramente agitados. As substâncias de ensaio deverão estar em contacto com toda a superfície da pele. No caso de algumas substâncias sólidas, poderá ser necessário aquecer a mistura a 30°C para fluidificar a substância ou ainda proceder a uma moagem para obtenção de um material granular ou pulverulento.

Para cada substância de ensaio serão utilizados 3 discos de pele. As substâncias de ensaio são aplicadas durante um período de 24 horas (ver também o ponto 1.5.3.4). A substância de ensaio deverá depois ser removida por lavagem em água corrente a uma temperatura máxima de 30°C, até à remoção completa de todo o material. A remoção das substâncias de ensaio que tenham eventualmente solidificado poderá ser facilitada utilizando um jacto de água a uma temperatura de cerca de 30°C.

1.5.3.2 Medições "TER"

A "TER" é medida utilizando um *databridge* de corrente alterna de baixa voltagem (p.ex.: AIM 401 ou 6401, ou outro modelo equivalente). Antes da medição da resistência eléctrica, a tensão superficial da pele é reduzida através da adição de um volume suficiente de etanol a 70% para cobrir toda a epiderme. Após alguns segundos, o etanol deverá ser removido invertendo o tubo e o tecido é depois hidratado através da adição de 3 ml de solução de sulfato de magnésio (154 mM). Os eléctrodos do *databridge* são colocados em duas extremidades do disco de pele de forma a medir a resistência em kΩ/disco (Figura 2). As dimensões dos eléctrodos e o comprimento de eléctrodo que deverá ficar livre por baixo da mola são indicados na Figura 1. A parte interior (mais grossa) do eléctrodo deverá estar apoiada à borda do tubo de PTFE durante a medição da resistência, de forma a garantir que o comprimento de eléctrodo mergulhado na solução de sulfato de magnésio seja constante. O eléctrodo exterior (mais fino) deverá ser colocado dentro da câmara receptora de forma a tocar o fundo da mesma. A distância entre a parte inferior da mola e o fundo do tubo de PTFE deverá ser mantida constante (Figura 1), visto que afecta o valor de resistência medido.

De notar que nos casos em que seja medida uma resistência superior a 20 kΩ, isso se poderá dever ao facto de a substância de ensaio estar a impedir o acesso da solução ao disco de epiderme. Para resolver esse problema, uma das possibilidades será tapar o tubo de PTFE com o dedo, usando luvas de borracha, e agitar durante cerca de 10 segundos. A solução de sulfato de magnésio deverá então ser deitada fora e substituída por solução fresca para a realização da medição.

A média dos valores de "TER" medidos poderá ser aceite, desde que os valores medidos em amostras de controlo positivo e negativo simultâneas com o ensaio se encontrem dentro dos valores normais para o método. As substâncias de controlo que poderão ser utilizadas e os respectivos valores aceitáveis para a metodologia e instrumentos aqui descritos são:

Controlo	Substância	Gama de resistência (kΩ)
Positivo	Ácido clorídrico 10 M (36%)	0,5 - 1,0
Negativo	Água destilada	10 - 25

1.5.3.3 Procedimento alterado para as substâncias tensioactivas e para as substâncias orgânicas neutras

Se os valores de "TER" das substâncias de ensaio que sejam tensioactivas ou que sejam substâncias orgânicas neutras forem inferiores ou iguais a 5 kΩ, poderá proceder-se a uma avaliação da penetração de corantes nos tecidos. Esse procedimento permitirá determinar se os resultados são ou não falsos positivos (2).

1.5.3.3.1 *Aplicação e eliminação do corante Sulforhodamina B*

Após o tratamento inicial com a substância de ensaio, aplicam-se à superfície epidérmica de cada disco de pele 150 µl de uma solução a 10% (p/v) do corante *Sulforhodamina B* em água destilada, durante 2 horas. Os discos são depois lavados em água corrente à temperatura ambiente durante cerca de 10 segundos, a fim de remover o corante em excesso/não fixado. Os discos de pele deverão então ser cuidadosamente retirados do tubo de PTFE e colocados num recipiente (p.ex.: um frasco de 20 ml) com água desmineralizada (8 ml). Os frascos são cuidadosamente agitados durante 5 minutos, para remover o corante que eventualmente ainda exista em excesso/não fixado. Esse procedimento de lavagem deverá depois ser repetido, após o que os discos de pele deverão ser transferidos para frascos com 5 ml de uma solução a 30% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) em água destilada e incubados a 60°C de um dia para o outro. Após a incubação, os discos de pele são retirados e deitados fora, e a solução centrifugada durante 8 minutos a 21°C (força relativa de centrifugação: ~175). Uma amostra de 1 ml do sobrenadante será então diluída num factor de 1:5 (v/v) [ou seja, 1 ml + 4 ml] numa solução a 30% (p/v) de SDS em água destilada. A densidade óptica (DO) da solução deverá então ser medida a cerca de 565 nm.

1.5.3.3.2 *Cálculo do teor em corante*

O teor do corante *Sulforhodamina B* por disco é calculado a partir dos valores de DO (coeficiente de extinção molar do corante *Sulforhodamina B* a 565nm = 8.7×10^4 ; peso molecular = 580). O teor deverá ser determinado para cada disco de pele e também em termos de valor médio dos replicados. Poderão ser aceitáveis valores médios para a ligação do corante, desde que os valores medidos nos controlos se encontrem dentro das gamas normais para o método. As gamas de concentração do corante que poderão ser utilizadas nas substâncias de controlo para a metodologia e instrumentos aqui descritos são:

Controlo	Substância	Gama de teores em corante (µg/disco)
Positivo	Ácido clorídrico 10 M (36%)	40 - 100
Negativo	Água destilada	15 - 35

1.5.3.4 *Informação adicional*

As substâncias de ensaio também poderão ser aplicadas por períodos de tempo menores (p.ex.: 2 horas), para identificação dos materiais mais severamente corrosivos. Contudo, no estudo de validação, verificou-se que o ensaio "TER" resulta na sobrestimação do potencial corrosivo de diversos materiais de ensaio quando se utiliza uma aplicação de apenas 2 horas (2), embora permita uma identificação correcta das substâncias corrosivas e não corrosivas após uma aplicação ao longo de 24 horas.

As propriedades e dimensões do aparelho a utilizar nos ensaios e o procedimento experimental aplicado podem influenciar os valores de "TER" obtidos. O limiar de corrosão de 5 kΩ foi desenvolvido a partir dos dados obtidos com o aparelho e com os procedimentos descritos no presente método. Poderão ser aplicáveis outros limiares e valores de controlo se as condições do ensaio forem significativamente diferentes. Logo, recomenda-se que a metodologia e os valores para o limiar de resistência sejam calibrados através do ensaio de uma série de materiais de referência a seleccionar de entre os materiais utilizados no estudo de validação (3).

1.6 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO - ENSAIO EM MODELO DE PELE HUMANA

O material de ensaio é aplicado localmente por um período que poderá ir até 4 horas num modelo tridimensional de pele humana, que inclui uma epiderme reconstruída com um *stratum corneum* funcional. Os materiais corrosivos são identificados pela sua capacidade de diminuição da viabilidade celular (que poderá ser determinada, por exemplo, utilizando o ensaio de redução MTT) abaixo de determinados limiares, em função dos períodos de exposição utilizados. O princípio do ensaio baseia-se na hipótese de que as substâncias químicas corrosivas são as que conseguem penetrar o *stratum corneum* (por difusão ou por erosão) e que são suficientemente citotóxicas para causar morte celular nas camadas celulares subjacentes.

1.7 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO - ENSAIO EM MODELO DE PELE HUMANA

1.7.1 Modelo de pele humana

Os modelos de pele humana podem ter diversas origens, mas devem sempre cumprir determinados critérios. Assim, o modelo deverá ter um *stratum corneum* funcional e uma camada subjacente de células vivas. O *stratum corneum* deverá ter uma função de barreira adequada. Essa característica poderá ser comprovada através da demonstração da resistência do modelo à citotoxicidade após aplicação de substâncias comprovadamente citotóxicas mas que normalmente não conseguem atravessar o *stratum corneum*. Para além disso, deverá demonstrar-se que o modelo permite obter resultados reprodutíveis em determinadas condições experimentais.

A viabilidade celular das células vivas do modelo deverá ser suficiente para permitir distinguir bem os resultados das substâncias de controlo positivo e negativo. A viabilidade celular (medida, por exemplo, pela redução do MTT, ou seja, por um valor de DO) após a exposição à substância de controlo negativo deverá manter-se em níveis aceitáveis para o modelo de pele específico que esteja a ser utilizado. Da mesma forma, os valores da viabilidade celular após exposição à substância de controlo positivo (por comparação com a viabilidade do controlo negativo) deverá também situar-se dentro de determinados limites. Mais importante ainda, o modelo preditivo utilizado deverá ter sido certificado de acordo com normas de validação internacionais.

1.7.2 Procedimento de ensaio

1.7.2.1 Aplicação do material de ensaio

Para os materiais líquidos deverá ser aplicada uma quantidade suficiente para cobrir toda a superfície de pele (no mínimo 25 µl/cm²). Para os materiais sólidos, deverá ser também aplicada uma quantidade suficiente para cobrir toda a pele, e humidificada por forma a garantir um bom contacto com a pele; quando necessário, os sólidos poderão ser moídos antes da aplicação. Deverá ser demonstrado que o método de aplicação utilizado é adequado para diversos tipos químicos (ver, por exemplo, a referência 2 da lista de bibliografia). Após o período de exposição, o material de ensaio deverá ser cuidadosamente lavado da superfície da pele com uma solução salina.

1.7.2.2 Medição da viabilidade celular

A viabilidade celular poderá ser medida através de qualquer método quantitativo devidamente validado. O ensaio utilizado mais frequentemente é a redução do MTT, que permite comprovadamente obter resultados fiáveis e reprodutíveis entre laboratórios (2). O disco de pele é colocado numa solução MTT a 0,3 mg/ml, a 20-28°C, durante 3 horas. O precipitado azul de *formazan* é depois extraído (extração com solvente) e a sua concentração é medida através da determinação da DO a um comprimento de onda entre 545 e 595 nm.

1.7.2.3 Outras informações

O modelo de pele utilizado, tal como o protocolo exacto para o tempo de exposição, os procedimentos de lavagem, etc., terão um impacto significativo sobre os resultados em termos de viabilidade celular. Recomenda-se que a metodologia e o modelo preditivo sejam calibrados através do ensaio de uma série de padrões a escolher de entre os produtos químicos utilizados no estudo de validação do ECVAM (3). Um dos factores críticos será a demonstração da reprodutibilidade do método utilizado intra e inter-laboratórios para diversos produtos químicos, de acordo com as normas internacionais. O método deverá cumprir, no mínimo, os critérios de validade científica já definidos (2), e os resultados dos estudos de validação devem ser publicados em revista científica dedicada a estudos comparativos.

2. DADOS

2.1 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

2.1.1 Ensaio "TER" em pele de rato

Os valores de resistência ($k\Omega$) do material de ensaio, dos controlos positivo e negativo e de qualquer produto químico padrão utilizado deverão ser apresentados sob a forma de uma tabela, incluindo todos os dados relativos aos replicados/repetição de experiências, os valores médios e as classificações daí deduzidas em termos de corrosividade.

2.1.2 Ensaio em modelo de pele humana

Os valores da DO e os dados relativos aos cálculos da viabilidade celular do material de ensaio, dos controlos positivo e negativo e de qualquer produto químico padrão utilizado deverão ser apresentados sob a forma de uma tabela, incluindo todos os dados relativos aos replicados/repetição de experiências, os valores médios e as classificações daí deduzidas em termos de corrosividade.

2.2 AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

2.2.1 Ensaio "TER" em pele de rato

Caso o valor médio de "TER" obtido para a substância de ensaio seja superior a $5 k\Omega$, a substância é considerada não corrosiva. Se o valor do "TER" for inferior a ou igual a $5 k\Omega$ e se a substância em causa não for tensoactiva nem um composto orgânico neutro, será considerada corrosiva.

Se a substância for tensoactiva ou um composto orgânico neutro e se o valor de "TER" for inferior ou igual a $5 k\Omega$, poderá proceder-se a um tratamento com corante. Se o teor médio de corante dos discos for superior ou igual ao teor médio de corante dos discos de controlo positivo com HCl a 36% testados em simultâneo, o resultado da substância de ensaio é um positivo verdadeiro e portanto a substância deve ser considerada corrosiva. Se o teor médio de corante dos discos for inferior ao teor médio de corante dos discos de controlo positivo com HCl a 36% testados em simultâneo, o resultado da substância de ensaio é um falso positivo e portanto a substância deve ser considerada como não corrosiva.

2.2.2 Ensaio em modelo de pele humana

O valor de DO do controlo negativo representa 100% de viabilidade celular, pelo que os valores obtidos para cada amostra de ensaio poderão ser utilizados para calcular uma percentagem de viabilidade relativa em relação ao controlo negativo. A percentagem que deverá ser considerada para separar os materiais de ensaio corrosivos dos não corrosivos (ou para distinguir entre as diferentes classes de corrosividade) deverão ser claramente definidos no modelo preditivo durante a validação do método, e deve ser demonstrado, no quadro do estudo de validação, que esse valor é apropriado (ver, por exemplo, a referência 2 da bibliografia).

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir, pelo menos, as seguintes informações:

Substância de ensaio:

- identificação, características físicas e, se necessário, físico-químicas. Se forem utilizadas substâncias de referência, deverá ser também apresentada a mesma informação em relação a essas substâncias.

Condições do ensaio

- procedimento de ensaio utilizado;
- descrição e justificação de eventuais modificações.

Resultados:

- tabelas com os valores de resistência (ensaio "TER") ou com as percentagens de viabilidade celular (ensaio em modelo de pele humana) dos materiais de ensaio, dos controlos positivo e negativo e de qualquer produto químico padrão que tenha sido utilizado, incluindo todos os dados relativos aos replicados/repetição de experiências e valores médios;
- descrição de outros efeitos eventualmente observados.

Discussão dos resultados

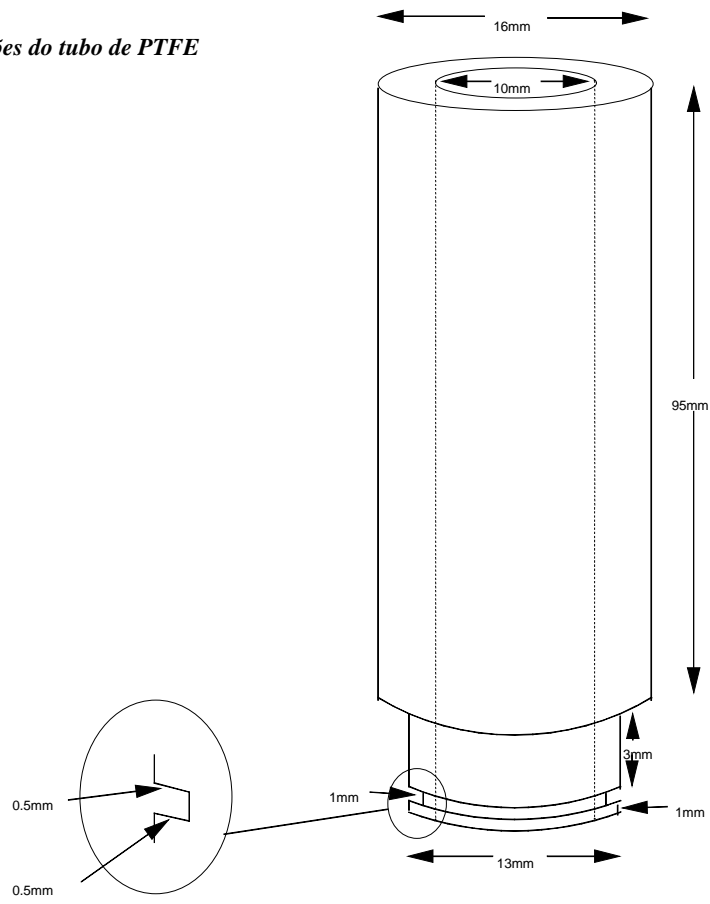
Conclusões

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* **26**, 275-280.
2. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzthutter, H-G. & 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.
3. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro* **12**, 471-482.
4. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test - modifications and validation. *Food & Chemical Toxicology* **24**, 507-512.
5. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. *Toxicology in Vitro* **6**, 191-194.
6. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998). An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA* **26**, 709-720.
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. & Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* **23**, 219-255.

Figura 1

Dimensões do tubo de PTFE



Dimensões do eléctrodo

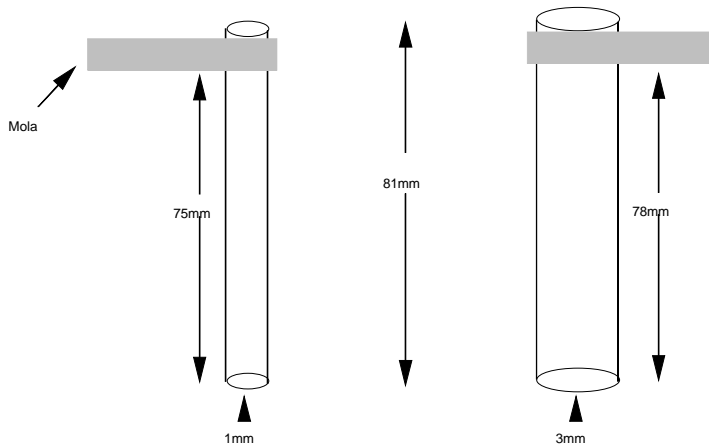
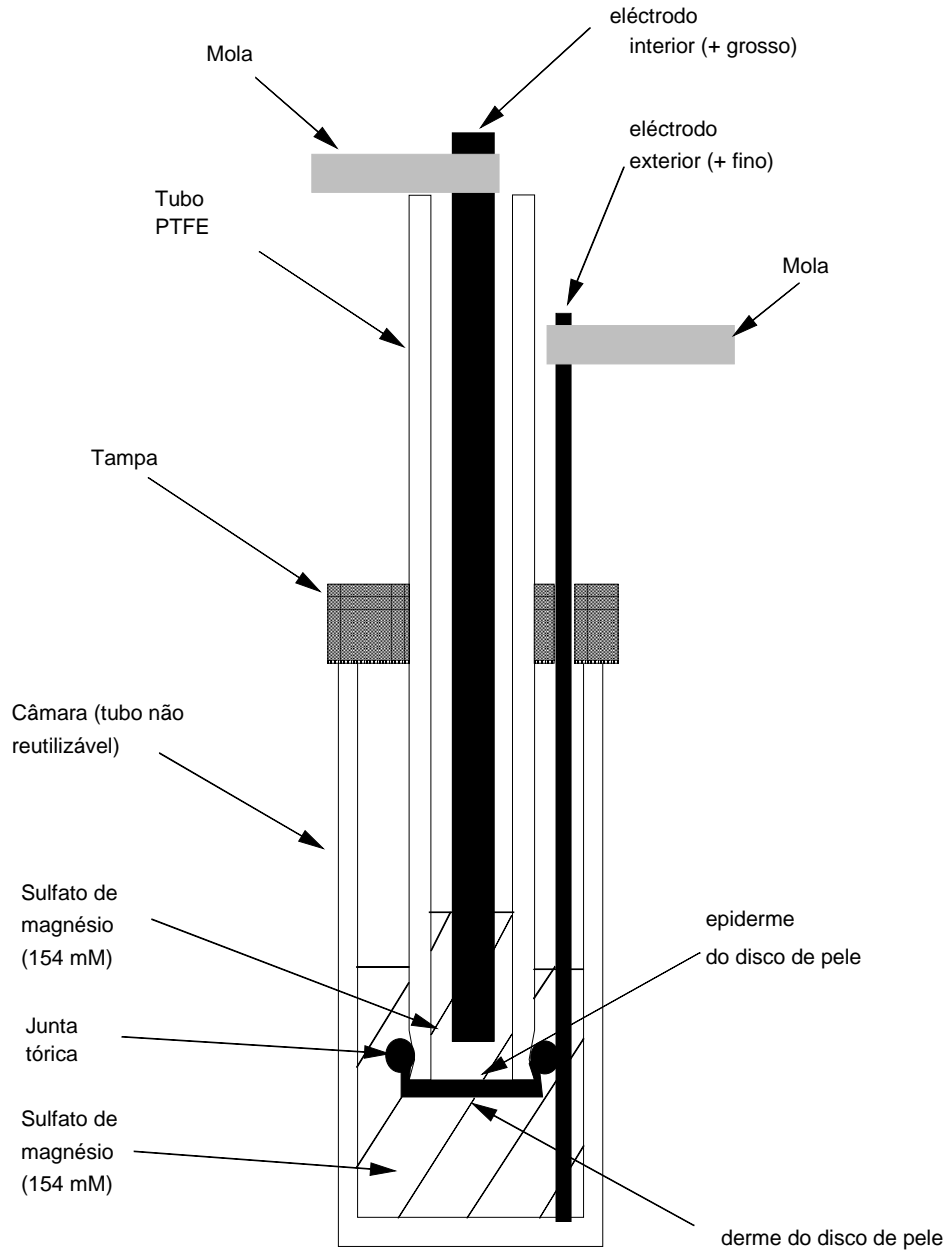


Figura 2

Montagem para o ensaio RET em pele de rato



B. 41. FOTOTOXICIDADE - ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE *IN VITRO* 3T3 NRU

1. MÉTODO

1.1 INTRODUÇÃO

A fototoxicidade é definida como uma reacção tóxica decorrente da exposição da pele a determinadas substâncias químicas, com posterior exposição à luz, ou por irradiação da pele na sequência da administração sistémica de uma substância química.

A informação decorrente do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU é utilizada para definir o potencial fototóxico de uma substância em estudo, ou seja, a existência ou ausência de possíveis riscos associados a uma substância em estudo, por exposição à radiação UV e visível.

Dado que o objectivo toxicológico do ensaio *in vitro* consiste na determinação da *fotocitotoxicidade* decorrente da acção combinada de uma substância e da uma radiação, o ensaio permite identificar compostos que exibem fototoxicidade *in vivo* na sequência da sua administração sistémica e difusão na pele, bem como compostos fotoirritantes na sequência da sua aplicação tópica na pele.

O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU foi elaborado e validado entre 1992 e 1997 no âmbito de um projecto conjunto UE/COLIPA (1)(2)(3), com o objectivo de estabelecer um método *in vitro* válido destinado a substituir os diversos ensaios *in vivo* utilizados. Num seminário da OCDE realizado em 1996 foi recomendada a adopção de uma abordagem sequencial *in vitro* para avaliar a fototoxicidade (4).

Os resultados do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU foram comparados com os efeitos de fototoxicidade/fotoirritação aguda *in vivo* em animais e no homem, tendo o ensaio revelado uma excelente previsibilidade dos referidos efeitos. O ensaio não é concebido para detectar outros efeitos nocivos decorrentes da acção combinada das substâncias químicas e a das radiações, nomeadamente a *fotogenotoxicidade*, a *fotoalergia* e a *fotocarcinogenicidade*, embora muitas substâncias químicas que apresentam essas propriedades exibam uma reacção positiva no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU. O ensaio não é também concebido para avaliar o *potencial fototóxico*.

O Anexo I apresenta uma abordagem sequencial para a determinação da fototoxicidade de substâncias químicas.

1.2 DEFINIÇÕES

Irradiância: intensidade da radiação ultravioleta (UV) ou visível que incide numa superfície, expressa em W/m² ou mW/cm².

Dose de radiação: quantidade (= intensidade × tempo) de radiação ultravioleta (UV) ou visível que incide numa superfície, expressa em joules (= W × s) por unidade de superfície, (por exemplo, J/m² ou J/cm²).

Bandas de comprimentos de onda da radiação UV: As designações recomendadas pela CIE (*Commission Internationale de L'Eclairage*) são: UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) e UVC (100-280nm). Utilizam-se também outras designações: o limite entre UVB e UVA é frequentemente situado a 320nm, podendo as radiações UVA subdividir-se em UV-A1 e UV-A2, com uma separação a cerca de 340nm.

Viabilidade celular: parâmetro que mede a actividade total de uma população celular (por exemplo, absorção do pigmento vital vermelho neutro pelos lisosomas celulares); em função da variável determinada e do tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total e/ou à vitalidade das células.

Viabilidade celular relativa: viabilidade celular expressa em relação aos ensaios de controlo negativos (apenas com o solvente) efectuados ao longo do procedimento de ensaio (+UV ou -UV), na ausência da substância em estudo.

Modelo de previsão: algoritmo utilizado para transformar os resultados de um ensaio de toxicidade numa previsão do potencial de toxicidade. No âmbito das presentes directrizes de ensaio, podem utilizar-se os parâmetros PIF e MPE para transformar os resultados do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU numa previsão do potencial fototóxico.

PIF (Photo Irritation Factor - Factor de fotoirritação): factor obtido por comparação entre duas concentrações citotóxicas igualmente eficazes (EC_{50}) da substância em estudo, respectivamente sem (-UV) e com exposição (+UV) a uma dose não citotóxica de radiação UVA/visível.

MPE (Mean Photo Effect - Fotefeito médio): parâmetro obtido por tratamento matemático do traçado de duas curvas concentração-efeito obtidas, respectivamente, sem (-UV) e com (+UV) exposição a uma dose não citotóxica de radiação UVA/visível.

Fototoxicidade: reacção tóxica aguda decorrente da exposição da pele a determinadas substâncias químicas e sua posterior exposição à luz, ou por irradiação da pele após a administração sistémica de uma substância química.

Fotoirritação: subcategoria do termo "fototoxicidade", utilizada apenas para descrever as reacções fototóxicas da pele decorrentes da exposição, por aplicação tópica ou administração oral, a substâncias químicas. As referidas reacções fototóxicas provocam sempre danos celulares não específicos (do tipo eritema solar).

Fotoalergia: reacção imunológica adquirida, que não ocorre na sequência da primeira exposição à substância química e à radiação, sendo necessário um período de indução de uma ou duas semanas para que se observe reacção cutânea.

Fotogenotoxicidade: reacção genotóxica observada para um parâmetro genético, produzido na sequência da exposição das células a uma dose não genotóxica de radiação UV/visível e a uma substância química não genotóxica.

Fotocarcinogenicidade: carcinogenicidade induzida pela exposição repetida às radiações e a uma substância química. Utiliza-se o termo "fotocarcinogénese" quando o efeito cancerígeno das radiações UV é reforçado pela exposição a uma substância química.

1.3 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Além da *clorpromacina* utilizada para o controlo positivo, que deve ser analisada paralelamente em cada ensaio, recomenda-se a utilização como substâncias de referência no ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU de um subconjunto das substâncias químicas utilizadas para o mesmo fim nos ensaios interlaboratoriais (1)(3)(13).

1.4 CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Existem inúmeras referências aos efeitos fototóxicos de muitas substâncias (5)(6)(7)(8). A única característica comum das referidas substâncias consiste na capacidade de absorver a energia luminosa da radiação solar. De acordo com a primeira lei da fotoquímica (lei de Grothaus-Draper), é necessária a absorção de uma quantidade suficiente de *quanta* de luz para que se observe fotorreacção. Deste modo, antes de realizar um ensaio biológico em conformidade com as presentes directrizes, deve determinar-se o espectro de absorção no UV/visível da substância em estudo (por exemplo de acordo com a directriz 101 da OCDE). Caso o coeficiente de extinção/absorção molar seja inferior a $10 \text{ litro} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, a substância carece de potencial fotorreactivo, não sendo necessário submetê-la ao ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU nem a qualquer outro ensaio biológico para a determinação de efeitos fotoquímicos nocivos (Anexo I).

1.5 PRINCÍPIO DO MÉTODO

Foram identificados quatro mecanismos mediante os quais a absorção de luz por um cromóforo pode ocasionar uma reacção fototóxica (7); todos os referidos mecanismos se traduzem em danos celulares. Deste modo, o ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU baseia-se na comparação da citotoxicidade de uma substância submetida a ensaio com ou sem exposição a uma dose não citotóxica de radiação UVA/visível. No âmbito do ensaio, a citotoxicidade é expressa numa redução, em termos de concentração, da absorção do pigmento vermelho neutro vital (*Neutral Red* - NR (9)) 24 horas após a administração da substância em estudo e a irradiação.

Efectua-se uma cultura de células Balb/c 3T3 durante 24 h, até à formação de monocamadas. Para cada substância em estudo, procede-se à pré-incubação, durante 1 h, de duas placas de 96 alvéolos com oito concentrações diferentes da substância. Expõe-se uma das placas a uma dose não citotóxica de 5 J/cm² UVA (experiência +UV), mantendo-se a outra na obscuridade (experiência -UV). Seguidamente, o meio de tratamento é substituído, em ambas as placas, por um meio de cultura; após uma nova incubação de 24 h, determina-se a viabilidade celular por análise da absorção do vermelho neutro (*Neutral Red Uptake* - NRU) durante 3 h. Calcula-se a viabilidade celular relativa, expressa em percentagem das amostras de controlo isentas da substância em estudo, para cada uma das oito concentrações de ensaio. Para a previsão do potencial fototóxico, comparam-se as reacções, em termos de concentrações, obtidas com (+UV) e sem (-UV) irradiação, em geral ao nível EC₅₀, ou seja, a concentração que inibe a viabilidade celular em 50 % relativamente às amostras de controlo isentas da substância.

1.6 CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Sensibilidade das células às radiações UVA - dados de referência: deve comprovar-se periodicamente a sensibilidade das células às radiações UVA. Para tal, as células são inoculadas à densidade utilizada no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU e irradiam-se as mesmas, no dia seguinte, com uma dose de 1 a 9 J/cm² de radiação UVA. Um dia depois, determina-se a viabilidade celular através do ensaio NRU. As células satisfazem os critérios de qualidade se, na sequência da irradiação com 5 J/cm² UVA, a sua viabilidade for superior ou igual a 80% da viabilidade das amostras mantidas na obscuridade. A viabilidade obtida utilizando a dose máxima de radiação UVA de 9 J/cm² não deve ser inferior a 50% da obtida com as amostras mantidas na obscuridade. O processo deve repetir-se aproximadamente em cada 10 passagens celulares.

Sensibilidade das células das amostras de controlo negativas à radiação UVA - ensaio em curso: o ensaio satisfaz os critérios de qualidade se as amostras de controlo negativas (células numa solução salina equilibrada de Earl (*Earl's Balanced Salt Solution* - EBSS) contendo ou não 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) ou 1% de etanol (EtOH) no ensaio +UVA apresentarem uma viabilidade igual ou superior a 80% da das células não irradiadas, no mesmo solvente, no ensaio paralelo realizado na obscuridade (-UVA).

Viabilidade das amostras de controlo negativas: a densidade óptica absoluta (OD_{540 NRU}) determinada no extracto NR das amostras de controlo negativas indica se as 1×10⁴ células inoculadas por alvéolo apresentam um tempo de replicação normal no decurso dos dois dias do ensaio. O ensaio satisfaz os critérios se a densidade óptica média (OD_{540 NRU}) das amostras de controlo não tratadas for igual ou superior a 0,2.

Controlo positivo: paralelamente a cada ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU deve efectuar-se um ensaio com uma substância fototóxica conhecida. Recomenda-se a utilização de clorpromacina (CPZ), substância de controlo positivo utilizada no estudo de validação EU/COLIPA. Foram definidos os seguintes critérios de aceitação para o uso de CPZ em conformidade com o protocolo normalizado do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU: CPZ irradiada (+UVA), EC₅₀= 0,1 a 2,0 µg/ml; CPZ não irradiada (-UVA), EC₅₀ = 7,0 a 90,0 µg/ml. O factor de fotoirritação (PIF), ou seja, a variação da EC₅₀, deve ser de, pelo menos, 6.

Em vez da CPZ, podem utilizar-se nos referidos controlos positivos paralelos outras substâncias fototóxicas conhecidas, adequadas à categoria química ou às características de solubilidade da substância em estudo. Neste caso, devem definir-se como critérios de aceitação para o ensaio, com base nos dados acumulados, os intervalos dos valores da EC₅₀ e o PIF ou o MPE .

1.7 DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.7.1 Preparação

1.7.1.1 Células

Recomenda-se a utilização de uma linhagem celular permanente de fibroblastos de rato - Balb/c 3T3, clon 31 - proveniente do ATCC ou ECACC, idêntica à utilizada no ensaio de validação. Podem também obter-se resultados satisfatórios por recurso a outras células ou linhagens celulares, aplicando o mesmo protocolo de ensaio, se as condições de cultura forem adequadas às necessidades específicas das células; todavia, nesse caso, é necessário demonstrar a equivalência.

Deve comprovar-se regularmente que as células não estão contaminadas por micoplasmas, devendo as mesmas apenas ser utilizadas se os resultados das referidas comprovações forem satisfatórios.

Uma vez que a sensibilidade das células às radiações UVA pode aumentar com o número de passagens, devem utilizar-se células Balb/c 3T3 que tenham sido objecto do menor número possível de passagens, preferivelmente menos de 100. Deve comprovar-se periodicamente a sensibilidade das células Balb/c 3T3 às radiações UVA por recurso ao procedimento de controlo de qualidade descrito nas presentes directrizes.

1.7.1.2 *Meios e condições de cultura*

Devem utilizar-se meios de cultura e condições de incubação adequados às passagens celulares comuns e ao procedimento de ensaio. No caso das células Balb/c 3T3, recomenda-se o uso de DMEM enriquecido com um 10% de soro de bovino recém-nascido, 4 mM de glutamina, penicilina e estreptomicina, incubado a 37°C numa atmosfera húmida com 7,5% de CO₂. É particularmente importante que as condições de cultura celular permitam manter o ciclo celular nos valores normais das células ou da linhagem celular utilizadas.

1.7.1.3 *Preparação das culturas*

Inoculam-se num meio de cultura de densidade adequada células provenientes de culturas-mães congeladas, efectuando-se pelo menos uma subcultura antes de utilizá-las no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.

Para o ensaio de fototoxicidade, inoculam-se as células num meio de cultura de densidade tal que impeça a confluência das culturas antes do termo do ensaio, ou seja, aquando da determinação da viabilidade celular 48h após a inoculação das células. No caso das células Balb/c 3T3 cultivadas em placas de 96 alvéolos, recomenda-se uma densidade de 1×10^4 células por alvéolo.

Para cada substância em estudo, inoculam-se as células de modo idêntico em duas placas diferentes de 96 alvéolos, mantendo-se as condições de cultura ao longo de todo o ensaio, excepto durante o período de irradiação de uma das substâncias (+radiação UVA/visível), enquanto que a outra se mantém na obscuridade (-radiação UVA/visível).

1.7.1.4 *Activação metabólica*

Embora, de modo geral, seja necessário recorrer a sistemas de activação metabólica para todos os ensaios *in vitro* de previsão do potencial genotóxico ou carcinogénico, no domínio da fototoxicologia não se conhece ainda qualquer substância química que necessite de uma transformação metabólica para actuar como fototoxina *in vivo* ou *in vitro*. Por conseguinte, não se considera necessário nem cientificamente justificado utilizar um sistema de activação metabólica no presente ensaio.

1.7.1.5 *Substância em estudo - Preparação*

As substâncias devem preparar-se imediatamente antes da utilização, excepto se os dados de estabilidade mostrarem que é possível armazená-las. Caso seja provável a ocorrência de fotodegradação rápida, pode ser necessário preparar as referidas substâncias à luz vermelha.

As substâncias em estudo são dissolvidas em soluções-tampão salinas, tais como uma solução salina equilibrada de Earl (EBSS) ou uma solução-tampão salina de fosfatos (*Phosphate Buffered Saline* - PBS), que não devem conter componentes proteicos nem corantes indicadores de pH que absorvam a luz, de modo a evitar interferências durante a irradiação.

As substâncias de ensaio fracamente solúveis em água devem dissolver-se em solventes adequados numa concentração 100 vezes superior à concentração final desejada, diluindo-se de seguida na proporção 1:100 com a solução-tampão salina. Caso se utilize um solvente, o a sua concentração volúmica deve permanecer constante (1%) em todas as culturas, isto é, tanto nas amostras de controlo negativo como nas amostras da substância em estudo em todas as concentrações.

Recomenda-se o uso do dimetilsulfóxido (DMSO) e do etanol (EtOH) como solventes. Podem utilizar-se outros solventes de citotoxicidade reduzida (por exemplo, acetona), devendo contudo avaliar-se devidamente as suas propriedades específicas, nomeadamente a possibilidade de reagir com a substância em estudo, de reduzir o efeito fototóxico ou de captar radicais.

Se necessário, pode recorrer-se a um agitador mecânico, um banho de ultra-sons ou ao aquecimento a 37°C para facilitar a dissolução.

1.7.1.6 Irradiação com UV - Preparação

Fonte de radiação: a escolha de uma fonte de radiação e de um filtrado adequados constitui o factor determinante dos ensaios de fototoxicidade. As regiões do visível e do UVA encontram-se, em geral, associadas à fotossensibilização (7)(10), enquanto que a gama do UVB possui menor importância neste domínio, apresentando em contrapartida uma elevada citotoxicidade directa que é multiplicada por 1000 entre 313 e 280 nm (11). Os critérios de selecção da fonte de radiação adequada devem incluir o requisito essencial da emissão de comprimentos de onda absorvíveis pela substância em estudo; por outro lado, a dose de luz (passível de ser obtida num período razoável) deve ser suficiente para detectar os fotossensibilizadores conhecidos. Além disso, os comprimentos de onda e as doses utilizadas não devem causar danos desnecessários ao sistema em estudo, nomeadamente devidos à emissão de calor (região do infravermelho).

Considera-se que a melhor fonte de luz é produzida por simuladores de radiação solar, que utilizam arcos de xénon ou arcos de mercúrio dopado-halogeneto de metal. Estes últimos apresentam a vantagem de emitir menos calor e de ser mais económicos, mas não reproduzem exactamente a luz solar. Dado que todos os simuladores de radiação solar emitem quantidades consideráveis de radiação UVB, devem utilizar-se filtros adequados para atenuar os respectivos comprimentos de onda altamente citotóxicos.

No ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU deve utilizar-se um espectro de irradiância praticamente isento de UVB (UVA:UVB ~ 1:20). A referência (3) inclui um exemplo da distribuição da irradiância espectral do simulador de radiação solar filtrada utilizado na validação do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU (3).

Dosimetria: antes de cada ensaio de fototoxicidade deve comprovar-se a intensidade da radiação (irradiância) por recurso a um medidor de UV de banda larga adequado, previamente calibrado em função da fonte de radiação. Deve comprovar-se o desempenho do aparelho, recomendando-se para tal a utilização de um segundo medidor de UV de referência do mesmo tipo, calibrado do mesmo modo. A utilização, a intervalos superiores, de um espectrorradiómetro para medir a irradiância espectral da fonte de luz filtrada e comprovar a calibração do medidor de UV de banda larga constitui a solução ideal, embora a manipulação dos instrumentos em causa necessite de pessoal devidamente qualificado.

O ensaio de validação mostrou que a dose de 5 J/cm² (UVA) não apresenta citotoxicidade para as células Balb/c 3T3, sendo suficientemente potente para activar as substâncias químicas fracamente fototóxicas. Para obter 5 J/cm² no período de 50 min, deve ajustar-se a irradiância a 1,666 mW/cm². Caso se utilize outra linha celular ou outra fonte de radiação, pode ser necessário adaptar ligeiramente a dose de raios UVA de um modo que não danifique as células e seja suficiente para detectar as fototoxinas de referência. A duração da exposição é calculada de acordo com a expressão:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose de irradiação}(\text{J/cm}^2) \times 1000}{\text{irradiância}(\text{mW/cm}^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W seg.})$$

1.7.2 Condições de ensaio

A concentração máxima da substância em estudo não deve exceder 100 µg/ml, uma vez que todas as substâncias fototóxicas foram detectadas a concentrações inferiores; além disso, a concentrações superiores, aumenta a incidência de falsos resultados positivos (13). O pH da concentração mais elevada da substância em estudo deve ser adequado (compreendido entre 6,5 e 7,8).

Devem determinar-se de forma adequada, em ensaios prévios, as gamas de concentração da substância em estudo com (+UVA) e sem (-UVA) irradiação. A gama e o intervalo de uma série de concentrações devem ajustar-se de modo a que as curvas concentração-resposta sejam fundamentadas experimentalmente. Devem utilizar-se concentrações em progressão geométrica, com um factor de diluição constante.

1.7.3 **Procedimento**¹

1.7.3.1 *1º dia*

Prepara-se uma suspensão de 1×10^5 células/ml no meio de cultura e colocam-se 100 µl de meio de cultura apenas nos alvéolos periféricos de uma placa de microtitulação de 96 alvéolos (= ensaios em branco). Nos restantes alvéolos colocam-se 100 µl de suspensão de 1×10^5 células/ml (= 1×10^4 células/alvéolo). Preparam-se duas placas com cada substância em estudo, destinando-se uma a determinar a citotoxicidade (-UVA) e a outra a fotocitotoxicidade (+UVA).

Incubam-se as células durante 24 h (7,5% CO₂, 37°C) até à formação de uma monocamada semiconfluenta. O referido período de incubação permite a recuperação, a aderência e o crescimento exponencial das células.

1.7.3.2 *2º dia*

Após a incubação, decanta-se o meio de cultura celular e efectua-se, por alvéolo, duas lavagens com 150 µl de EBSS/PBS. Adicionam-se 100 µl de EBSS/PBS com a concentração adequada da substância em estudo ou, no caso das amostras de controlo negativo, apenas solvente. Adicionam-se 8 concentrações diferentes da substância em estudo. Incubam-se as células com a substância em estudo durante 60 minutos, na obscuridade (7,5% CO₂, 37°C).

Na componente (+UVA) do ensaio, irradiam-se as células durante 50 minutos, à temperatura ambiente, através da cobertura da placa de 96 alvéolos, com uma dose de 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Utilizar um ventilador para evitar a condensação de água sob a cobertura. Para o ensaio (-UVA), colocar na obscuridade a segunda série de placas, à temperatura ambiente, durante 50 min. (= tempo de exposição aos raios UVA).

Decanta-se a solução de ensaio, efectuando duas lavagens com 150 µl de EBSS/PBS. Substitui-se a EBSS/PBS pelo meio de cultura e incuba-se (7,5% CO₂, 37 °C) até ao dia seguinte (18-22 h).

1.7.3.3 *3º dia*

Análise microscópica

Examinam-se as células num microscópio com dispositivo de contraste de fase. Registam-se as alterações morfológicas das células devidas aos efeitos citotóxicos da substância em estudo. A comprovação em causa é recomendada com o objectivo de excluir erros experimentais, embora as observações efectuadas no seu âmbito não sejam utilizadas para avaliar a citotoxicidade nem a fototoxicidade.

Ensaio de absorção do vermelho neutro

Lavam-se as células com 150 µl de EBSS/PBS pré-aquecida. Remove-se a solução de lavagem sacudindo ligeiramente. Adicionam-se 100 µl de meio com NR e incuba-se durante 3h a 37 °C, em atmosfera húmida com 7,5% CO₂.

Após a incubação, elimina-se o meio com NR e lavam-se as células com 150 µl de EBSS/PBS. Decanta-se e enxuga-se totalmente a EBSS/PBS. (*alternativa*: centrifugar a placa invertida.)

Adicionam-se exactamente 150 µl de solução de desorção do NR (solução de etanol/ácido acético recentemente preparada).

Agita-se rapidamente a placa num agitador de microplacas durante 10 min, até que o NR seja extraído das células e forme uma solução homogénea.

Mede-se a densidade óptica do extracto de NR a 540 nm num espectrofotómetro, utilizando como referência os ensaios em branco. Armazenam-se os dados num ficheiro de formato adequado (por exemplo, ASCII), com vista ao seu tratamento posterior.

¹ A referência bibliográfica (12) contém informações complementares.

2 RESULTADOS

2.1 QUALIDADE E QUANTIDADE DOS RESULTADOS

Os dados devem permitir uma análise significativa das respostas obtidas para cada concentração, com e sem irradiação UVA/visível. Caso se observe fototoxicidade, tanto a gama de concentrações como o intervalo entre cada concentração devem ser estabelecidos de modo que permita adaptar o traçado de uma curva aos dados experimentais. Uma vez que a substância em estudo pode não produzir efeitos citotóxicos à concentração-limite de 100 µg/ml definida para o ensaio realizado na obscuridade (-UVA), exibindo todavia uma elevada citotoxicidade no ensaio com irradiação (+UVA), pode ser necessário utilizar em cada componente do ensaio gamas de concentração de magnitude diversa, de modo a obter resultados de qualidade adequada. Caso não se observe citotoxicidade em nenhuma das componentes do ensaio (-UVA e +UVA), bastará utilizar concentrações separadas por um intervalo apreciável, até à concentração máxima.

Não é necessário comprovar um resultado claramente positivo, repetindo o ensaio. Os resultados claramente negativos não necessitam também de comprovação caso o ensaio tenha sido realizado com concentrações suficientemente altas. Nessas circunstâncias, bastará realizar um ensaio principal e um ou vários ensaios prévios com o objectivo de definir as gamas de concentração.

Os ensaios cujos resultados se situem no limite do modelo de predição devem ser repetidos para fins comprovativos.

Caso se considere necessário repetir o ensaio, pode ser importante alterar as condições experimentais de modo a obter um resultado inequívoco. Neste contexto, a preparação das soluções da substância constitui um aspecto fundamental. A alteração das referidas condições, expressa, por exemplo, na utilização de co-solventes, na trituração da amostra ou na utilização de um banho de ultra-sons, pode, pois, revelar-se fundamental. Como alternativa, pode também alterar-se o período da incubação antes da irradiação: no caso de substâncias instáveis em água, pode ser conveniente reduzir o referido período.

2.2 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Se possível, deve determinar-se a concentração de substância em estudo que induz uma inibição do 50% da absorção celular de vermelho neutro (EC₅₀). Para tal, pode aplicar-se aos resultados de resposta às concentrações qualquer método de regressão não linear adequado (de preferência, uma função de Hill ou uma regressão logística) ou outros métodos de ajustamento (14). Antes de utilizar um determinado valor de EC₅₀ nos cálculos posteriores, deve comprovar-se devidamente a qualidade do ajustamento. Podem também utilizar-se no cálculo do valor de EC₅₀ métodos de ajustamento gráfico. Nesse caso, recomenda-se a utilização de papel probabilístico (eixo x: log, eixo e: probit), uma vez que, frequentemente, a função concentração-resposta se torna praticamente linear na sequência da transformação.

2.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS (MODELOS DE PREVISÃO)

2.3.1 *Modelo de previsão - versão 1: factor de fotoirritação (PIF)*

Se, tanto em presença (+UVA) como na ausência (-UVA) de radiação, se obtiverem curvas concentração-resposta completas, pode calcular-se o factor de fotoirritação (PIF) por recurso à fórmula seguinte:

$$A) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

A obtenção de um valor PIF < 5 traduz a ausência de potencial fototóxico, enquanto que um PIF ≥ 5 traduz a existência de potencial fototóxico.

Se uma substância se revelar citotóxica quando irradiada (+UVA) mas não na ausência de irradiação (-UVA), não é possível calcular o PIF, embora o referido resultado indique a existência de potencial fototóxico. Em tais casos, pode calcular-se um valor "> PIF" se o ensaio de citotoxicidade (-UV) tiver decorrido até à concentração de ensaio máxima (C_{máx}), valor que se utiliza no cálculo de "> PIF":

$$B) \quad > PIF = \frac{C_{máx}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Caso se obtenha apenas um valor "> PIF", qualquer valor superior a 1 traduz um potencial fototóxico.

Se não for possível calcular a EC₅₀ (-UV) nem a EC₅₀ (+UV) porque a substância não produz efeitos citotóxicos mesmo à concentração de ensaio máxima, tal significa que a substância não possui potencial fototóxico. Nessas condições, utiliza-se um "PIF = *1" teórico para caracterizar o resultado.

$$C) \quad PIF = *1 = \frac{C_{\text{máx}}(-UV)}{C_{\text{máx}}(+UV)}$$

Caso se obtenha apenas um valor "PIF = *1", o ensaio traduz a ausência de potencial fototóxico.

Nos casos b) e c), devem tomar-se na devida conta as concentrações obtidas no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU aquando da previsão do potencial fototóxico.

2.3.2 Modelo de previsão - versão 2: fotoefeito médio (MPE)

Como alternativa, pode utilizar-se uma nova versão do modelo de previsão do potencial fototóxico elaborada com base nos dados obtidos no estudo de validação EU/COLIPA (15) e comprovada num ensaio "cego" realizado no âmbito de um estudo posterior relativo à fototoxicidade *in vitro* de substâncias utilizadas como filtros de UV (13). Este modelo permite superar a limitação do modelo baseado no PIF nos casos em que não é possível obter um valor de EC₅₀. O modelo utiliza o fotoefeito médio (MPE), que constitui um parâmetro baseado na comparação das curvas concentração-resposta, na sua totalidade. A Universidade Humboldt de Berlim elaborou um programa informático especial para a aplicação do modelo MPE, que pode obter-se gratuitamente.

2.4 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A obtenção de um resultado positivo no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU (PIF ≥ 5 ou MPE ≥ 0,1) indica que a substância em estudo apresenta potencial fototóxico. Se o referido resultado foi obtido com concentrações inferiores a 10 µg/ml, é provável que a substância em estudo apresente também efeitos fototóxicos em diversas condições de exposição *in vivo*. Caso se obtenha um resultado positivo apenas com a concentração de ensaio máxima de 100 µg/ml, pode ser necessário, para avaliar o perigo ou o poder fototóxico, ter em conta outros aspectos, tais como a penetração e a absorção cutâneas e a possível acumulação da substância na pele, ou submeter a substância a outro tipo de ensaios, com o objectivo de confirmar os resultados, utilizando, por exemplo, um modelo de pele humana *in vitro*.

A obtenção de um resultado negativo no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU (PIF < 5 ou MPE < 0,1) indica que a substância em estudo não apresenta efeitos fototóxicos nas células de mamífero cultivadas nas condições em causa. Se for possível submeter a substância a ensaio até à concentração máxima de 100 µg/ml, a obtenção de um resultado negativo indica que a mesma não possui de potencial fototóxico, sendo improvável que produza efeitos fototóxicos *in vivo*. Nos casos em que se obtenham reacções tóxicas idênticas (EC₅₀+UV e EC₅₀-UV) com concentrações inferiores, devem interpretar-se os dados do mesmo modo. Todavia, caso não se observe toxicidade (+UV e -UV) e a solubilidade da substância em estudo em água tenha limitado as concentrações utilizadas a menos de 100 µg/ml, pode questionar-se a compatibilidade da substância com o método de ensaio, devendo encarar-se a possibilidade de realizar um ensaio de confirmação (por exemplo, com um modelo de pele *in vitro* ou *ex vivo*, ou um ensaio *in vivo*).

3 RELATÓRIO

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substância em estudo:

- Dados de identificação e nº CAS, se conhecido
- Natureza física e pureza
- Propriedades físico-químicas relevantes para a realização do estudo
- Estabilidade e fotoestabilidade, se conhecidas

Solvente:

- Justificação da escolha do solvente
- Solubilidade da substância em estudo no solvente
- Percentagem de solvente presente no meio de tratamento (EBSS ou PBS)

Células:

- Tipo e proveniência das células
- Ausência de micoplasma
- Número de passagens celulares, se conhecido
- Sensibilidade das células à radiação UVA, determinada com o equipamento de irradiação utilizado no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU

Condições de ensaio (a) - *incubação antes do tratamento e após o mesmo*:

- Tipo e composição do meio de cultura
- Condições de incubação (concentração de CO₂, temperatura e humidade)
- Duração da incubação (tratamento prévio e posterior)

Condições de ensaio (b) - *tratamento com a substância*:

- Fundamentação da escolha das concentrações da substância em estudo utilizadas nos ensaios com e sem irradiação UV/visível
- Caso a substância em estudo seja fracamente solúvel e não-citotóxica, fundamentação da escolha da maior concentração utilizada
- Tipo e composição do meio de tratamento (solução-tampão salina)
- Duração do tratamento químico

Condições de ensaio (c) - *irradiação*:

- Fundamentação da escolha da fonte de radiação utilizada
- Características da irradiância espectral da fonte de radiação
- Características de transmissão/absorção do filtro ou filtros utilizados
- Características do radiómetro e condições de calibração
- Distância entre a fonte de radiação e o sistema de ensaio
- Irradiância UVA à referida distância, expressa em mW/cm²
- Duração da exposição à radiação UV/visível
- Dose de radiação UVA (irradiância × tempo), expressa em J/cm²
- Temperatura utilizada para as culturas celulares irradiadas e as culturas mantidas na obscuridade

Condições de ensaio (d) - *ensaio NRU*

- Composição do meio NR
- Duração da incubação em NR
- Condições de incubação (concentração de CO₂, temperatura e humidade)
- Condições de extracção do NR (agente de extracção, duração)
- Comprimento de onda utilizado para a leitura espectrofotométrica da densidade óptica do NR
- Segundo comprimento de onda (referência), se aplicável
- Substância utilizada para o ensaio em branco do espectrofotómetro, se aplicável

Resultados

- Viabilidade celular obtida para cada concentração da substância em estudo, expressa em percentagem da viabilidade média dos controlos
- Curvas concentração-resposta (concentração da substância em estudo - viabilidade celular relativa), obtidas nos ensaios +UVA e -UVA paralelos
- Análise dos dados provenientes das curvas concentração-resposta: se possível, cálculo automático/cálculo do valor de EC₅₀ (+UVA) e EC₅₀ (-UVA)
- Comparação das duas curvas concentração-resposta obtidas com e sem irradiação UVA/visível, calculando o factor de fotoirritação (PIF) ou o fotoefeito médio (MPE)
- Classificação do potencial fototóxico
- Critérios de aceitação do ensaio (a) - *controlo negativo paralelamente*:
 - viabilidade absoluta (densidade óptica do extracto de NR) das células irradiadas e as não irradiadas
 - dados de referência do controlo negativo, média e desvio-padrão
- Critérios de aceitação do ensaio (b) - *controlo positivo paralelo*:
 - EC₅₀ (+UVA), EC₅₀ (-UVA) e PIF da substância de controlo positivo
 - dados de referência da substância de controlo positivo: EC₅₀ (+UVA), EC₅₀ (-UVA) e PIF, média e desvio-padrão

Discussão dos resultados

Conclusões

4 BIBLIOGRAFIA

1. 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., Pfannenbecker, O.U., Potthast, J., De Silva, O.U., Steiling, W. And Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro* **8**, 793-796.
2. 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.
3. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O.U., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, O.U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W and Brantom, P. (1998) EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in Vitro* **12**, 305-327.
4. OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods - *OECD Publications Office*, Paris, 1996.
5. Lovell W. W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxicology in Vitro* **7**, 95-102.
6. Santamaria, L. And Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research progress in organic, biological and medicinal chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
7. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O.U. And Sladowski, D. (1994). In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA **22**, 314-348.
8. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of photobiology "; edited by KC Smith. Plenum Press, New York; 2nd edition, pp. 79-110.
9. Borenfreund, E. And Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **24**, 119-124.
10. Lambert L. A, Warner W.G. And Kornhauser A. (1996). Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology "; edited by FN Marzulli and HI Maibach. Published by Taylor & Francis, Washington DC; 5th Edition, pp. 515-530.
11. Tyrrell R. M. And Pidoux M (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Research* **47**, 1825-1829.
12. ZEBET / ECVAM / COLIPA - Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test. Drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
13. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O.U., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. And Pfannenbecker (1998). A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test. ATLA **26**, 679-708.
14. Holzhütter, H.G. And Fiquema, J. (1995) Mathematical modelling of cellular responses to external signals. *Journal of Biological Systems* **3**, 127-138.
15. 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**, 445-462.

ANEXO 1

Papel do ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU numa abordagem sequencial dos ensaios de fototoxicidade de substâncias químicas

