

Como comunicar dados *in vitro* Guia prático 1

Versão 1.1 – Julho de 2012

ABC

ADVERTÊNCIA JURÍDICA

O presente documento contém orientações sobre o Regulamento CRE, que descrevem obrigações dele decorrente e o modo como devem ser cumpridas. No entanto, recorda-se aos utilizadores que o texto do Regulamento CRE é a única referência jurídica que faz fé e que as informações contidas no presente documento não constituem um aconselhamento jurídico. A Agência Europeia dos Produtos Químicos não assume qualquer responsabilidade pelo conteúdo do presente documento.

Declaração de exoneração de responsabilidade: Esta é uma versão de trabalho de um documento originalmente publicado em inglês. O documento original está disponível no site da ECHA.

Versão	Alterações
1 – março de 2010	Primeira publicação
1.1 – julho de 2012	
Guia prático 1: Como comunicar dados <i>in vitro</i>	

Referência: ECHA-10-B-04.1-PT

ISBN-13: 978-92-9217-765-2

ISSN: 1831-6654

Data de publicação: julho de 2012

Idioma: PT

© Agência Europeia dos Produtos Químicos, 2012

Página de rosto © Agência Europeia dos Produtos Químicos

Reprodução autorizada mediante indicação da fonte da seguinte forma: «Fonte: Agência Europeia dos Produtos Químicos, <http://echa.europa.eu/>», e mediante notificação por escrito enviada à Unidade de Comunicação da ECHA (publications@echa.europa.eu).

Este documento estará disponível nas 22 línguas seguintes:

Alemão, Búlgaro, Checo, Dinamarquês, Eslovaco, Esloveno, Espanhol, Estónio, Finlandês, Francês, Grego, Húngaro, Inglês, Italiano, Letão, Lituano, Maltês, Neerlandês, Polaco, Português, Romeno e Sueco

Quaisquer perguntas ou observações relacionadas com o presente documento devem ser enviadas (introduzindo a referência e a data de emissão) utilizando o formulário de pedido de informação. Este formulário encontra-se disponível na página «Contactos ECHA» em:

http://echa.europa.eu/about/contact_pt.asp

Agência Europeia dos Produtos Químicos

Endereço postal: P.O. Box 400, FI-00121 Helsínquia, Finlândia

Morada: Annankatu 18, Helsínquia, Finlândia

Índice

1. INTRODUÇÃO	4
2. UTILIZAÇÃO DE DADOS E MÉTODOS <i>IN VITRO</i> NOS TERMOS DO REACH	5
3. QUESTÕES RELATIVAS À UTILIZAÇÃO E DOCUMENTAÇÃO/COMUNICAÇÃO DE DADOS E MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA EFEITOS DE REGISTO NOS TERMOS DO REGULAMENTO REACH.....	6
3.1 Que documentos de orientação REACH devo ler?	6
3.2 Como avaliar e comunicar a adequação do método e dos dados <i>in vitro</i> para utilização nos termos do Regulamento REACH.....	6
3.3 Os métodos e dados <i>in vitro</i> podem ser utilizados para efeitos de classificação e rotulagem e/ou avaliação dos riscos?	6
3.4 Como utilizar métodos e dados <i>in vitro</i> como parte da abordagem de suficiência de prova?.....	7
3.5 Como podem os dados <i>in vitro</i> ser utilizados em métodos comparativos por interpolação e criação de categorias?	7
3.6 Como comunicar métodos e dados <i>in vitro</i> na IUCLID 5?.....	7
3.7 Como comunicar a utilização de dados de ensaios <i>in vitro</i> para cumprir as informações-padrão exigidas para os ensaios <i>in vivo</i> ?	8
4. HIPERLIGAÇÕES ÚTEIS	10
ANEXO 1. : EXEMPLOS	11

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos do Regulamento REACH (CE n.º 1907/2006) consiste em assegurar a proteção da saúde humana e do ambiente. Para tal, é necessário obter informações adequadas sobre as propriedades das substâncias químicas, com vista à sua classificação e rotulagem e/ou à avaliação dos riscos.

Os registantes devem apresentar informações para efeitos de registo e avaliação, conforme especificado nos anexos VI-XI do Regulamento REACH.

Nos termos do artigo 13.º, n.º 1, e do artigo 25.º, n.º 1, do Regulamento REACH, é possível produzir informações por outros meios além dos ensaios, devendo a utilização de animais vertebrados em ensaios ser considerada como último recurso. Além disso, o artigo 13.º, n.º 4, do Regulamento REACH estabelece que os ensaios e análises ecotoxicológicas e toxicológicas devem ser realizados em conformidade com as disposições da Diretiva 86/609/CEE.

O Regulamento REACH visa igualmente o aperfeiçoamento, a redução e a substituição dos ensaios em animais (estratégia 3R – «refinement, reduction, replacement»), bem como a promoção de métodos de ensaio alternativos (em conformidade com a Diretiva 86/609/CEE). A Diretiva 86/609/CEE do Conselho relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos Estados-Membros respeitantes à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos incentiva o apoio ao desenvolvimento, validação e aceitação de métodos que permitam reduzir, aperfeiçoar ou substituir a utilização de animais de laboratório.

Através da promoção de métodos alternativos, vários métodos de ensaio *in vitro* foram submetidos a validação internacional e aceites para utilização regulamentar. A validação é o processo através do qual é estabelecida a fiabilidade e pertinência de um procedimento para um objetivo específico.

Na UE, o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) da Direção-Geral do Centro Comum de Investigação (DG JRC) é responsável pela coordenação da validação científica dos novos métodos de ensaio alternativos. Estão identificadas cinco fases principais na evolução dos novos métodos de ensaio, que incluem o desenvolvimento de ensaios, a fase de pré-validação, a fase de validação, a avaliação independente e, por último, a evolução até à aceitação regulamentar. O processo de pré-validação é essencial para assegurar que qualquer método incluído num estudo de validação formal cumpre de forma adequada os critérios estabelecidos para inclusão nesse estudo.

Os princípios de pré-validação e validação e os critérios relativos à realização de estudos de validação de métodos de ensaio novos ou atualizados estão descritos no Documento de orientação sobre os requisitos de informação (R.4) e são adotados no Documento de Orientações 34 da OCDE.

Devido à prioridade elevada atribuída pela UE à adoção de métodos alternativos validados e pertinentes e às vantagens da coordenação com o Programa de Diretrizes de Ensaio da OCDE para assegurar uma harmonização e aceitação de âmbito global, os projetos relativos aos métodos alternativos são submetidos preferencialmente ao processo da OCDE. No entanto, em caso de demora indevida nesse fórum ou de necessidade urgente na União Europeia, os trabalhos para adoção de um novo método alternativo poderão ser levados a cabo paralelamente ou canalizados direta e exclusivamente para o processo da UE. Se o referido método for posteriormente adotado pela OCDE, o método da UE será atualizado em conformidade.

2. UTILIZAÇÃO DE DADOS E MÉTODOS *IN VITRO* NOS TERMOS DO REACH

Os dados produzidos por métodos de ensaio *in vitro* podem ser utilizados nos termos do Regulamento REACH desde que as informações relativas ao parâmetro em consideração sejam suficientes para efeitos de classificação e rotulagem e/ou avaliação dos riscos. Esses dados podem ser utilizados para substituir total ou parcialmente os requisitos de informação que, de outro modo, deveriam ser gerados através de dados *in vivo*. No entanto, os dados *in vitro*, incluindo os dados gerados através de métodos que não cumprem os critérios de validação adotados internacionalmente (adequação) para um parâmetro específico, devem igualmente ser considerados e apresentados no dossiê de registo como parte da recolha de todas as informações disponíveis e utilização numa abordagem de suficiência de prova (REACH, anexo XI, 1.2) ou de apoio ao agrupamento de substâncias (REACH, anexo XI, 1.5).

Existem três categorias de dados e métodos *in vitro* que podem ser utilizadas para efeitos do registo de substâncias nos termos do Regulamento REACH, nomeadamente métodos *in vitro* validados (adequados), métodos *in vitro* pré-validados (adequados), mas também outros dados *in vitro* gerados através da utilização de métodos *in vitro* não pré-validados.

a) Métodos *in vitro* validados

Os métodos *in vitro* validados, depois de cientificamente aceites e de acordo com os princípios de validação internacionalmente adotados (R4 e GD 34 da OCDE), podem substituir no todo ou em parte um ensaio *in vivo*, em função dos fins para o qual o método foi validado e adotado. Alguns métodos de ensaio *in vitro* estão incluídos nas informações-padrão exigidas para as diferentes gamas de tonelagem (por exemplo, os ensaios *in vitro* de irritação cutânea e os ensaios *in vitro* para avaliar a mutagenicidade). Estes são métodos validados e considerados adequados para o fornecimento das informações necessárias para efeitos de classificação e rotulagem e/ou avaliação dos riscos.

b) Métodos *in vitro* pré-validados

Os ensaios *in vitro* que cumprem os critérios de pré-validação aprovados internacionalmente (R4 e GD 34 da OCDE) são também considerados adequados para utilização nos termos do Regulamento REACH quando os resultados destes ensaios indicam a presença de uma determinada propriedade perigosa. No entanto, se os resultados dos métodos pré-validados não indicarem a presença de uma propriedade perigosa (resultados negativos), os mesmos deverão ser confirmados através do ensaio pertinente especificado no anexo VII-X para o parâmetro correspondente (REACH, anexo XI, 1.4). No caso de serem utilizados dados resultantes de métodos *in vitro* pré-validados, os critérios ECVAM para a entrada na fase de pré-validação, incluindo a prova de reprodutibilidade do método, a pertinência do seu mecanismo e a capacidade preditiva, devem ser indicados no dossiê de registo.

c) Métodos *in vitro* não validados previamente

Além disso, os métodos pré-validados e outros dados (não validados previamente) *in vitro* podem ser utilizados no contexto da recolha de informações para fornecer dados suplementares para a avaliação e interpretação de dados *in vivo* ou *in vitro*, como parte do modo/mechanismo de ação (por exemplo, dados *in vitro* cinéticos, toxicogenómica, metabolómica) e para apoio do regime normal de ensaios, conforme especificado no anexo XI (utilização de dados já existentes, método comparativo por interpolação e agrupamento de substâncias químicas, suficiência de prova). No entanto, para todos os casos, o dossiê de registo deverá especificar, de forma clara, circunstanciada e bem documentada, o objetivo subjacente à utilização de tais métodos. Se aplicável (por exemplo, métodos pré-validados utilizados como prova suficiente), devem ser indicados os critérios de adequação conforme especificado nas orientações.

3. QUESTÕES RELATIVAS À UTILIZAÇÃO E DOCUMENTAÇÃO/COMUNICAÇÃO DE DADOS E MÉTODOS *IN VITRO* PARA EFEITOS DE REGISTO NOS TERMOS DO REGULAMENTO REACH

3.1 Que documentos de orientação REACH devo ler?

As orientações relativas à utilização de métodos *in vitro* no contexto do Regulamento REACH estão disponíveis no Guia de orientação sobre os requisitos de informação (Capítulo R.4.3.1.1 Dados *in vitro*), bem como no Guia de orientação sobre requisitos de informação e avaliação da segurança química (R7a e R7b) para cada parâmetro (eco)toxicológico.

3.2 Como avaliar e comunicar a adequação do método e dos dados *in vitro* para utilização nos termos do Regulamento REACH

Quando um método de ensaio *in vitro* validado é apresentado no dossiê de registo, os critérios de qualidade especificados no protocolo da Comissão Europeia ou da OCDE para o parâmetro correspondente devem ser avaliados e comunicados no registo de estudo de parâmetros pertinente da IUCLID. Desde que o método conste do Regulamento dos Métodos de Ensaio da Comissão ou das Diretrizes de Ensaio da OCDE, a adequação de um parâmetro específico já terá sido objeto de avaliação a nível internacional e o método poderá ser utilizado para substituir total ou parcialmente ensaios em animais. Devem ser tidas em conta as limitações eventualmente descritas no protocolo do método de ensaio ou nos documentos de orientação técnica (por exemplo, alguns métodos *in vitro* adequam-se apenas à estimativa de resultados positivos (indicação da presença de uma propriedade perigosa) mas não de resultados negativos).

Se um registante pretender utilizar métodos *in vitro* pré-validados para cumprir os requisitos de informação nos termos do Regulamento REACH, apenas poderá fazê-lo nas condições especificadas no anexo XI, 1.4. A adequação do método aos critérios ECVAM deve ser avaliada e comunicada no dossiê da IUCLID apresentado.

No que respeita à utilização de todos os outros métodos *in vitro* como parte da abordagem de suficiência de prova, as questões relativas à qualidade do método, tais como a pertinência do material de ensaio, a pertinência biológica e os padrões de qualidade (reprodutibilidade dos resultados dos ensaios), devem ser avaliadas e incluídas no dossiê da IUCLID como parte do registo de estudo de parâmetros.

3.3 Os métodos e dados *in vitro* podem ser utilizados para efeitos de classificação e rotulagem e/ou avaliação dos riscos?

Apenas podem ser utilizados métodos *in vitro* validados e pré-validados em condições específicas para efeitos de classificação e rotulagem e/ou avaliação dos riscos. Se for utilizado um método *in vitro* validado que conste dos anexos VII-X ou um método de ensaio pré-validado que indique as propriedades perigosas de uma substância, os resultados poderão ser considerados adequados para efeitos de classificação e rotulagem e/ou avaliação dos riscos. Os restantes dados *in vitro* poderão ser utilizados apenas como parte da abordagem de suficiência de prova para apoiar a tomada de decisões.

3.4 Como utilizar métodos e dados *in vitro* como parte da abordagem de suficiência de prova?

As informações geradas através de métodos *in vitro* podem ser úteis para fornecer provas suplementares que ajudem a explicar as conclusões dos ensaios *in vivo*. Em especial, os dados cinéticos e de metabolismo gerados *in vitro* podem contribuir para a identificação do modo de ação quando combinados com dados resultantes de ensaios *in vivo*, bem como para o desenvolvimento de modelos cinéticos.

As metodologias avançadas como, por exemplo, a toxicogenómica, podem também fornecer dados para a avaliação dos riscos e ajudar à tomada de decisões no que respeita à elaboração de estratégias de ensaio eficientes e eficazes, bem como proporcionar a base mecanicista para determinar o modo de ação, a pertinência biológica dos efeitos observados em estudos *in vivo* e a pertinência humana.

Se forem utilizados dados *in vitro* no dossiê de registo como parte da abordagem de suficiência de prova («WoE»), deverão ser seguidas as orientações fornecidas no Guia prático 2 relativo à utilização da suficiência de prova (Guia prático 2: Como comunicar a suficiência de prova). Em especial, os dados devem ser comunicados com pormenores suficientes que permitam determinar a pertinência na avaliação dos riscos, devendo a pertinência desses dados para o caso específico ser igualmente bem documentada e comunicada no dossiê de registo.

3.5 Como podem os dados *in vitro* ser utilizados em métodos comparativos por interpolação e criação de categorias?

Os dados gerados através de métodos de ensaio *in vitro* podem ser utilizados para colmatar falhas de informação aquando da execução de métodos comparativos por interpolação em substâncias idênticas ou durante o agrupamento de substâncias químicas. Nesses casos, os dados *in vitro* podem esclarecer considerações de ordem mecanicista e contribuir para reforçar a robustez dos métodos comparativos por interpolação no contexto dos produtos metabólicos comuns a partir de substâncias idênticas (utilização de perfis metabólicos).

Além disso, os dados *in vitro* também podem ser utilizados para demonstrar o valor biológico da «terminologia mecanicista» utilizada nos modelos (Q)SAR, por exemplo, para ajudar a definir o domínio de aplicabilidade de um modelo (Q)SAR.

3.6 Como comunicar métodos e dados *in vitro* na IUCLID 5?

Quando são introduzidos métodos *in vitro* validados nos dossiês de registo, em cumprimento dos requisitos do Regulamento REACH, o resumo de estudo circunstanciado ou o resumo de estudo devem ser fornecidos no dossiê da IUCLID. Nesse caso, deverão ser seguidos o Guia prático relativo aos resumos de estudos circunstanciados («RSS» (*robust study summaries*)) (Guia Prático 3: Como comunicar resumos de estudos circunstanciados) e as Orientações da IUCLID (Manual do Utilizador Final da IUCLID 5), devendo ainda ser apresentada uma descrição suficiente das condições, dos resultados e da interpretação dos ensaios para efeitos de tomada de decisões relativas à classificação e rotulagem e/ou avaliação dos riscos.

Se os resultados de um método *in vitro* pré-validado forem apresentados como um estudo-chave por forma a cumprir os requisitos de informação para um parâmetro específico, a pertinência do método não deverá suscitar dúvidas. Além dos requisitos relativos aos resumos de estudos circunstanciados (ver Guia Prático 3: Como comunicar resumos de estudos circunstanciados e Manual do Utilizador Final da IUCLID), o dossiê de registo deverá incluir documentação que comprove o cumprimento dos critérios de avaliação da adequação, em conformidade com os critérios ECVAM, a fim de avaliar a adequação do método e da sua

eventual aceitação para efeitos de classificação e rotulagem e/ou avaliação dos riscos. Neste caso, convém recordar que, se os resultados desses métodos não indicarem a presença de determinadas propriedades perigosas para o parâmetro em questão, deverá ser realizado um ensaio pertinente para confirmar os resultados negativos, exceto se for possível dispensar os ensaios nos termos das regras gerais e específicas relativas à adaptação do regime comum de ensaio (REACH, anexo VII-XI).

Se os resultados de um método *in vitro* pré-validado ou de um método *in vitro* não validado previamente forem apresentados como estudos de apoio ou como parte de uma abordagem de suficiência de provas ou ainda como estudos ignorados, tal deverá ser claramente indicado e justificado no dossiê de registo, através dos campos pertinentes da IUCLID nos registos de estudo de parâmetros. Encontram-se disponíveis mais informações sobre a utilização de informações numa abordagem de suficiência de prova no Guia Prático 2 relativo à suficiência de prova (Guia prático 2: Como comunicar a suficiência de prova). Caso essas informações sejam utilizadas no contexto da suficiência de prova, deverão ser apresentadas informações pormenorizadas sobre o método no formato da IUCLID para resumos de estudos circunstanciados. A pertinência das conclusões do(s) estudo(s) em relação às conclusões obtidas a partir das informações gerais deve também ser documentada em pormenor. Além disso, poderá ser necessário apresentar descrições pormenorizadas de outros estudos, caso sejam pertinentes. Em especial, no que respeita a estudos imperfeitos mas que indicam resultados críticos, devem ser igualmente preparados resumos de estudos circunstanciados que sublinhem as fragilidades dos estudos. Esses estudos podem ser sinalizados como «disregarded study» [estudo ignorado] no campo «Purpose flag» [Sinalizador de finalidade] na IUCLID.

3.7 Como comunicar a utilização de dados de ensaios *in vitro* para cumprir as informações-padrão exigidas para os ensaios *in vivo*?

No que respeita a alguns parâmetros, os registantes podem fornecer informações resultantes de ensaios *in vitro* para satisfazer requisitos de informação que, de outro modo teriam que ser preenchidos com dados resultantes de ensaios *in vivo*. Por exemplo, os dados resultantes de um estudo *in vivo* de irritação da pele constituem informações-padrão exigidas para uma substância registada em quantidades iguais ou superiores a 10 toneladas por ano (REACH, anexos VIII a X). Neste exemplo, o registante pode justificar que os dados de ensaios *in vivo* de irritação da pele e/ou corrosão adequados, que podem ter sido realizados no contexto de uma estratégia de ensaio integrada, cumprem as regras específicas (coluna 2 dos anexos VII a X) ou gerais (anexo XI) relativas à adaptação do regime normal de ensaios. No futuro, poderão ser desenvolvidas outras abordagens que envolvam um conjunto de ensaios *in vitro* para avaliar de forma adequada outros parâmetros, por exemplo, a sensibilização da pele, sempre que seja possível determinar o potencial de sensibilização da pele de uma substância no âmbito de uma estratégia de ensaio que utilize uma abordagem de suficiência de prova através de um conjunto de métodos de ensaio *in vitro*.

No cenário acima descrito, a justificação para a adaptação do regime normal de ensaios deve ser incluída no dossiê de registo. Por conseguinte, além do resumo circunstanciado de estudo criado para os estudos *in vitro* (ver ponto 3.6 supra), o registante deverá criar e preencher parcialmente um registo de estudo de parâmetros no dossiê da IUCLID para os respetivos requisitos de informação aplicáveis aos estudos *in vivo*. Se este procedimento não for cumprido, a apresentação do dossiê não será aprovada na verificação técnica de integralidade (VTI) e não será possível apresentar com êxito o dossiê de registo.

Para preencher o registo de estudo de parâmetro *in vivo*, o registante deve selecionar um sinalizador de finalidade de dispensa de dados, que pode ser, por exemplo, «study scientifically unjustified» [estudo não justificado do ponto de vista científico] ou «other justification» [outra justificação]. Devem ser incluídos argumentos mais pormenorizados no campo «Justification for Data waiving» [Justificação para a dispensa dos dados]. A justificação dependerá dos dados

do caso. A título de exemplo, com base nos critérios especificados no anexo XI, ponto 1.4., são previstos estudos *in vitro* adequados.

Estão disponíveis informações úteis sobre a utilização de dados *in vitro* no Webinar para registantes principais realizado em 29 de fevereiro de 2012 sobre «Como utilizar dados *in vitro* para preencher os requisitos de informação do REACH»

((http://echa.europa.eu/web/guest/view-article/-/journal_content/7def3c04-4b2b-4cfd-86d0-5ce36797faa8)).

4. HIPERLIGAÇÕES ÚTEIS

Guia prático 3: Como comunicar resumos circunstanciados de estudos

http://echa.europa.eu/documents/10162/13643/pg_report_robust_study_summaries_pt.pdf

Guia prático 2: Como comunicar a suficiência de prova

http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_weight_of_evidence_pt.pdf

Tracking System for alternative test methods review (TSAR) da DG JRC (Sistema de Acompanhamento para a Análise, Validação e Aprovação de Métodos de ensaio Alternativos no Contexto dos Regulamentos Comunitários sobre Produtos Químicos)

<http://tsar.jrc.ec.europa.eu/>

A TSAR é uma ferramenta que proporciona uma visão clara do estado dos métodos alternativos à medida que os mesmos evoluem de protocolos puramente científicos submetidos a pré-validação para uma utilização ativa num contexto de regulamentação.

Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos - ECVAM

<http://ecvam.jrc.it/>

OECD Chemicals Testing - Guidelines (Orientações da OCDE sobre os ensaios de produtos químicos)

http://www.oecd.org/departement/0,3355,en_2649_34377_1_1_1_1_1,00.html

Regulamento CE que estabelece Métodos de Ensaio

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142:0003:0280:PT:PDF>

Manual do utilizador final da IUCLID 5

<http://iuclid.echa.europa.eu/index.php?fuseaction=home.documentation&type=public>

Anexo 1. : Exemplos

O Anexo 1 contém exemplos ilustrativos do preenchimento de um registo de estudo de parâmetros da IUCLID nos casos em que:

1. um método de ensaio *in vitro* validado é utilizado como estudo-chave
2. um método de ensaio *in vitro* pré-validado é utilizado como estudo-chave
3. um método de ensaio *in vitro* não validado previamente é utilizado como estudo de apoio

1. Método de ensaio *in vitro* validado utilizado como estudo-chave

Administrative Data

Purpose flag: key study robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving:

Justification for data waiving:

Study result type: experimental result Study period: From 22 to 28 August, 2009

Reliability: 1 (reliable without restriction)

Rationale for reliability incl. deficiencies: GLP, Guideline study

Data source

Reference

Reference type	Author	Year	Title	Bibliographic s...	Testing laborat...	Report no.	Owner company	Company study...	Report date
study report	Mustermann	2009	In vitro Skin Irritation: Human Skin Model		testing Laboratory	1234567			2009-09-12

Add... Edit... Delete Move up Move down Select Insert

Data access: data submitter is data owner

Data protection claimed: yes, but willing to share

Materials and methods

Type of method: in vitro

Test guideline

Qualifier	Guideline	Deviations
according to	other guideline: EU Method B.46 (Skin Irritation)	no

Add... Edit... Delete Move up Move down

Principles of method if other than guideline:

GLP compliance: yes

Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across): yes

Test materials

Test material identity

Identifier	Identity
CAS number	123456-78-9

Details on test material

- State the analytical purity of the substance
 - Lot/Batch number with expiration date

Test system

Type of coverage

Preparation of test site

Vehicle

unchanged (no vehicle)

Amount/concentration applied

10 ul applied to each tissue. Spread to match tissue size.

Duration of treatment / exposure

15 min

Observation period

Number of animals

Not applicable

Details on study design

Any other information on materials and methods incl. tables

State here how the test was performed and what were the test conditions e.g.
 - positive and negative controls
 - test/incubation conditions
 - how many parallel samples
 - how was the relative viability of the tissue calculated and used for classification

For the current test, an irritation potential of a test item according to EU classification R38 is predicted if the mean relative tissue viability of three individual tissues is reduced below 50% of the negative control.

<i>In vitro</i> result	<i>In vivo</i> prediction
Mean tissue viability <50%	Irritant , R38
Mean tissue viability > 50%	Non-irritant

The absolute OD 570 nm of the negative control tissues in the MTT test is an indicator of tissue viability obtained after the shipping and storing procedure and under specific conditions of the assay. Tissue viability meets the acceptance criterion if the mean OD of the two tissues is ≥ 0.6 . An assay meets the acceptance criterion if mean relative tissue viability of the Positive Control is $\geq 40\%$.

Results and discussions

Irritation / corrosion results

Irritation parameter	Basis	Time point	Score	Max. score	Reversibility	Remarks
other: Absorbance (570 nm)	mean	10 min	1.02	1.07	no data	

Irritant/corrosive response data

State here the relevant information of the results.

Any other information on results incl. tables

Results after the treatment with the test substance

Dose group	Treatment interval	Absorbance 570 nm Tissue 1	Absorbance 570 nm Tissue 2	Absorbance 570 nm Tissue 3	Mean Absorbance of 3 Tissues	Rel. Absorbance [% of Negative control]
Negative control	15 min	1.2	1.5	1.2	1.3	100.00
Positive control	15 min	0.3	0.3	0.3	0.3	23.1
Test substance	15 min	0.85	1.05	0.95	0.95	73.1

Optical evaluation of the MTT-reducing capacity of the test item after 1 hour incubation with MTT-reagent did not show blue colour.

The decrease in relative absorbance values noted for the test substance was well below the threshold for irritancy of relative absorbance=50%. Therefore the test substance is not considered to possess an irritant potential.

Applicant's summary and conclusion

Interpretation of results
not irritating

Criteria used for interpretation of results

Conclusions
Under the experimental conditions of this study, test substance is considered to be non-irritant to skin.

Executive summary

State here a brief description of the method, the results and the conclusions.

2. Método de ensaio *in vitro* pré-validado utilizado como estudo-chave

Nota: Se pretender utilizar dados de sensibilização cutânea *in vitro* como estudo-chave a fim de obter aprovação na Verificação Técnica de Integralidade (VTI), deverá fornecer um registo de estudo de parâmetros suplementar acompanhado de uma justificação para dispensar o ensaio *in vivo*, conforme demonstrado no exemplo seguinte (REACH, anexo VII, 8.3, coluna 2).

Dispensa

Administrative Data

Purpose flag

robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving other justification

Justification for data waiving Annex XI 1.4. We have provided the results from an *in vitro* study which covers the skin sensitisation endpoint. The method used is currently under validation process.

Study result type

Study period

Reliability

Rationale for reliability incl. deficiencies

Estudo-chave

Administrative Data

Purpose flag: key study robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving:

Justification for data waiving:

Study result type: experimental result Study period: April 2009

Reliability: 2 (reliable with restrictions)

Rationale for reliability incl. deficiencies: GLP, test method is under validation.

Data source

Reference

Reference type	Author	Year	Title	Bibliographic s...	Testing laborat...	Report no.	Owner company	Company study...	Report date
study report	Mustermann	2009	In vitro skin sensitisation		Testing Laboratory	123456			2009-11-30

Add... Edit... Delete Move up Move down Select Insert

Data access: data submitter is data owner

Materials and methods

Type of method: in vitro

Type of study: other:

Test guideline

Qualifier	Guideline	Deviations
according to	other guideline: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) according publication X	no

Add... Edit... Delete Move up Move down

Principles of method if other than guideline

The method is based on the increase of CD86 and CD54 expression on THP-1 cell line. Both of these surface molecules are involved in leukocyte recruitment and activation. Expression is measured by Flow Cytometry.

GLP compliance: yes

Test materials

Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across): no

Test material identity

Identifier	Identity
CAS number	123456-78-9

Add... Edit... Delete Move up Move down

Details on test material

If the test material is not completely the same as the registered substance, then you need to give here the details of the test material e.g.

- molecular formula (of other than the submission substance)
- purity of the substance
- Lot/Batch No.

LLNA

Vehicle

Concentration

State here the concentrations used in test system with justifications. The chemical should be used at a subtoxic concentrations

No. of animals per dose

THP-1 cell culture is used instead of animals.

Details on study design (LLNA)

Positive control substance(s)

other: positive control used e.g. DNCB

Any other information on materials and methods incl. tables

Protocol:

- Pre-culture of THP-1 cells for 48 h or 72 h
- Seed and culture at the final cell count/well with chemical being tested with 3 different concentration for 24 h or 48 h in 24 well plate
- Divide test samples in to 3 groups
- Treat cells with blockin agent for 15 min on ice to avoid non specific binding and wash the cells
- Stain cells with appropriate anti-CD86, anti-CD54 and IgG antibodies for 30 min on ice
- Wash the cells and resuspend them in to PBS and add PI
- Flow-cytometric analysis

The results are calculated using MFI (mean fluorescence intensity)

MFI of chemical treated cells - MFI of chemical treated isotype control cells
MFI of vehicle control cells- MFI of vehicle isotype control cells

Clear positive results could be 2 to 3 -fold greater than the control value.

Any other information on results incl. tables

Please give here the results of a given test incl. positive and negative control values. Tabular form with all parallel values including mean values would be appreciated.

Applicant's summary and conclusion

Interpretation of results

sensitising

Conclusions

Give here your conclusions.

3. Método de ensaio *in vitro* não validado previamente utilizado como estudo de apoio (IUCLID - secção 7.1.1. Toxicocinética básica)

Administrative Data

Purpose flag: supporting study robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving:

Justification for data waiving:

Study result type: experimental result Study period: April 2009

Reliability: 2 (reliable with restrictions)

Rationale for reliability incl. deficiencies: peer reviewed publication

Data source

Reference type	Author	Year	Title	Bibliographic s...	Testing laborat...	Report no.	Owner company	Company study...	Report date
publication	Mustermann et al	2009	In vitro liver cell metabolism of chemical A	In vitro cell Biology Journal			N/A		

Data access: data published

Materials and methods

Type of method: in vitro

Objective of study: metabolism

Test guideline

Qualifier	Guideline	Deviations
no guideline followed		

Principles of method if other than guideline: Explain here the principle of the method e.g. Measurements of the induced activities of Cytochrome P450 isozymes in the presence of SUBSTANCE A by using PICM-19H cell line.

GLP compliance: yes

Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across): yes

Test material identity

Identifier	Identity
CAS number: 12345-67-8	

Radiolabelling: no

Test materials

Details on test material: Provide details on test material based on the information available.

Confidential details on test material

Test animals

Species: other: PICM-19 cell line

Administration / exposure

Route of administration
other:

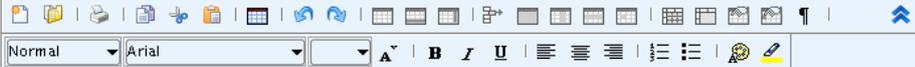
Vehicle
unchanged (no vehicle)

Details on exposure
  

Duration and frequency of treatment / exposure
Provide information on cell culture and reagents (including sources)

Doses / concentrations
provide information on the preparation of doses, and the actual concentrations tested.

Any other information on materials and methods incl. tables



Provide information on the assays employed in the study, giving the basis of the assay and description of the procedure followed.

State here the detailed protocol of a method used e.g.

- cell culture conditions and reagents used e.g. the passage number
- exposure doses and duration exposure
- cell viability assay e.g. plate reader and what was the wave length used
- Induction of CYP450 e.g. how were the cells treated
- Assay of induced phase I and II activities e.g. treatment time, how were the samples analysed (wave length measured etc.)
- Protein determination (how it was measured)
- LC-MS e.g. how the samples were treated before measurement, what were the measurement conditions etc.)
- any other relevant information on test conditions

Information
Information Modification history Access Consultation Attachments Annotations Validation

In vitro Cell Biology Vol1 p. 25-28.doc / 23.5 KB

Remarks

Metabolite characterisation studies

Metabolites identified
yes

Details on metabolites
Provide details on the metabolites formed, the analytical techniques for detection, statistical methods, quality criteria if available.

Any other information on results incl. tables



Provide available tables here with the results obtained from the study.

Overall remarks, attachments

Overall remarks

Normal Arial 10 A B I U

Provide an evaluation of the findings of the study including their relevance to the toxicological profile of the registered substance.

Under the section Illustration (picture/graph) you can upload graphs of the results if available.

Attached background material

Attached document	Remarks
<input type="button" value="Add..."/> <input type="button" value="Edit..."/> <input type="button" value="Delete"/> <input type="button" value="Move up"/> <input type="button" value="Move down"/>	

Attached full study report

Attached full study report
<input type="button" value="Add..."/> <input type="button" value="Edit..."/> <input type="button" value="Delete"/> <input type="button" value="Move up"/> <input type="button" value="Move down"/>

Illustration (picture/graph)

Applicant's summary and conclusion

Interpretation of results

other:

Conclusions

Provide conclusions on the findings of the study.

Executive summary

Normal Agency FB 8 A B I U

Cross-reference to other study

Report the studies where the information from this study summary can be used: e.g. Repeated dose toxicity study.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY
ANNANKATU 18, P.O. BOX 400,
FI-00121 HELSINKI, FINLAND
ECHA.EUROPA.EU