

II

(Atti non legislativi)

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO (UE) N. 900/2014 DELLA COMMISSIONE

del 15 luglio 2014

recante modifica, ai fini dell'adeguamento al progresso tecnico, del regolamento (CE) n. 440/2008 che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 13, paragrafo 2,

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento (CE) n. 440/2008 della Commissione ⁽²⁾ istituisce i metodi di prova per determinare le proprietà fisico-chimiche, la tossicità e l'ecotossicità delle sostanze chimiche applicabili ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006.
- (2) È necessario aggiornare il regolamento (CE) n. 440/2008 per includervi in via prioritaria nuovi e aggiornati metodi di prova adottati di recente dall'OCSE, per tener conto del progresso tecnico e ridurre il numero di animali usati a scopi di sperimentazione, conformemente alla direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio ⁽³⁾. I portatori di interesse sono stati consultati in merito alla presente proposta.
- (3) Questo adeguamento al progresso tecnico contiene sei nuovi metodi per determinare la tossicità e altri effetti sulla salute, che includono uno studio della neurotossicità nella fase dello sviluppo, uno studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione, un saggio di mutagenesi in vivosu roditori transgenici, un test in vitro per la valutazione degli effetti sulla sintesi degli ormoni steroidei, nonché due metodi in vivo per valutare gli effetti estrogenici e (anti)androgenici.
- (4) Occorre pertanto modificare di conseguenza il regolamento (CE) n. 440/2008.
- (5) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato istituito dall'articolo 133 del regolamento (CE) n. 1907/2006,

⁽¹⁾ GUL 396 del 30.12.2006, pag. 1.

⁽²⁾ Regolamento (CE) n. 440/2008 della Commissione, del 30 maggio 2008, che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (GUL 142 del 31.5.2008, pag. 1).

⁽³⁾ Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (GUL 276 del 20.10.2010, pag. 33).

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato del regolamento (CE) n. 440/2008 è modificato conformemente all'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 15 luglio 2014

Per la Commissione

Il presidente

José Manuel BARROSO

ALLEGATO

L'allegato del regolamento (CE) n. 440/2008 è così modificato:

Sono inseriti i capitoli B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 e B.58:

«B.53. STUDIO DELLA NEUROTOSSICITÀ NELLA FASE DELLO SVILUPPO

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 426 per le prove sulle sostanze chimiche (2007). Nel giugno del 1995, il gruppo di lavoro dell'OCSE sulla tossicità per la riproduzione e lo sviluppo, riunito a Copenaghen, ha esaminato la necessità di aggiornare le linee guida OCSE esistenti in materia e metterle a punto delle nuove per gli endpoint non ancora contemplati (1). Il gruppo di lavoro ha raccomandato che la linea guida per le prove volte a determinare la neurotossicità nella fase dello sviluppo sia redatta in base ad un orientamento dell'agenzia statunitense per la protezione dell'ambiente (EPA), che nel frattempo è stato riveduto (2). Nel giugno del 1996 si è tenuta a Copenaghen una seconda riunione di consultazione, intesa ad elaborare indicazioni più precise che servissero al segretariato per definire una nuova linea guida per le prove sulla neurotossicità nella fase dello sviluppo, a partire dagli elementi principali, quali i dettagli relativi alla scelta della specie animale, il periodo di somministrazione, il periodo di sperimentazione, gli endpoint da esaminare, nonché i criteri per la valutazione dei risultati. Nel 1998 è stata pubblicata una linea guida statunitense per la valutazione del rischio di neurotossicità (3). Nell'ottobre del 2000 si è tenuta una riunione di consultazione di esperti dell'OCSE in parallelo ad un seminario dell'ILSI (Istituto internazionale per le scienze della vita), mentre un'ulteriore riunione di consultazione degli esperti ha avuto luogo a Tokyo nel 2005. Questi incontri sono stati organizzati per discutere le questioni scientifiche e tecniche relative alla linea guida vigente e le raccomandazioni che ne sono scaturite sono state prese in considerazione in sede di elaborazione del presente metodo di prova (4)(5)(6)(7). I documenti d'orientamento dell'OCSE n. 43, *Reproductive Toxicity Testing and Assessment* (8), e n. 20, *Neurotoxicity Testing* (9), contengono ulteriori informazioni sull'esecuzione, sull'interpretazione e sulla terminologia utilizzata per il presente metodo di prova.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

2. Gli effetti neurotossici prodotti da alcune sostanze chimiche sugli esseri umani e su altre specie nella fase dello sviluppo sono noti (10)(11)(12)(13). Per esaminare e valutare le caratteristiche tossiche di una sostanza chimica può essere necessario determinarne il potenziale di neurotossicità nella fase dello sviluppo. Gli studi di neurotossicità nella fase dello sviluppo sono intesi a fornire dati, comprese le caratterizzazioni dose-risposta, relativi ai potenziali effetti funzionali e morfologici sullo sviluppo del sistema nervoso della progenie imputabili all'esposizione in utero e nei primi stadi di vita.
3. Questo tipo di studio può essere a sé stante, costituire parte integrante di uno studio di tossicità per la riproduzione e/o di uno studio di neurotossicità nell'adulto [ad esempio, i metodi di prova B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)], oppure fungere da complemento ad uno studio di tossicità per lo sviluppo prenatale [ad esempio, il metodo di prova B.31 (17)]. Quando lo studio di neurotossicità nella fase dello sviluppo è integrato o collegato ad un altro studio, è necessario preservare l'integrità di entrambi. Tutte le prove devono conformarsi alla legislazione applicabile oppure alle linee guida per l'uso di animali da laboratorio nella ricerca, nazionali o sovranazionali (cfr. nota 18).
4. Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue la prova deve tenere conto di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame, in particolare riguardo a identità, struttura e proprietà fisico-chimiche, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo, i dati tossicologici sulle sostanze chimiche di struttura affine e l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per dimostrare a tutti i soggetti interessati l'adeguatezza della prova per la protezione della salute umana e servono a scegliere la giusta dose iniziale.

PRINCIPIO DELLA PROVA

5. La sostanza in esame viene somministrata agli animali durante la gestazione e la lattazione. Le madri sono sottoposte a prova per esaminare gli effetti nelle femmine durante la gravidanza e la lattazione e per ottenere, all'occorrenza, informazioni comparative (rispetto alla progenie). La valutazione della neurotossicità è effettuata su discendenti scelti a caso all'interno delle nidi e consiste in osservazioni volte a rilevare anomalie neurologiche e comportamentali macroscopiche, attraverso l'esame dello sviluppo fisico, dell'ontogenesi del comportamento, dell'attività motoria, della funzione motoria e sensoriale, dell'apprendimento e della memoria, come pure mediante la valutazione del peso del cervello e della neuropatologia durante lo sviluppo postnatale e in età adulta.

6. Se la prova costituisce uno studio a sé stante, è possibile applicare sugli animali supplementari disponibili in ogni gruppo protocolli specifici valutativi del neurocomportamento, della neuropatologia, della neurochimica o dell'elettrofisiologia, che possono completare i dati ottenuti mediante gli esami raccomandati nel presente metodo di prova (16)(19)(20)(21). Questi protocolli integrativi, che possono essere applicati sia sulle madri che sui figli, possono rivelarsi particolarmente utili quando l'osservazione empirica, gli effetti previsti o il meccanismo/modo di azione indicano un tipo specifico di neurotossicità. Possono anche essere utilizzati protocolli ex vivo o in vitro, purché non alterino l'integrità dei protocolli in vivo.

PREPARAZIONE DELLA PROVA

Selezione della specie animale

7. La specie sperimentale preferita è il ratto, ma si possono eventualmente usare anche altre specie. Si tenga presente, tuttavia, che il numero di giorni di gestazione e di sviluppo postnatale considerato nel presente metodo di prova si riferisce ai ceppi di ratti più utilizzati e pertanto, in caso si faccia uso di una specie diversa o di un ceppo inabituale, è necessario che tale numero di giorni si equivalga. L'uso di un'altra specie deve essere giustificata, oltre che sulla base di dati tossicologici, farmacocinetici e/o di altra natura, sulla disponibilità di esami neurocomportamentali e neuropatologici postnatali specifici della specie in questione. Se una prova precedente ha prodotto risultati preoccupanti, occorre considerare la specie o il ceppo da cui sono ottenuti. Poiché i diversi ceppi di ratto rispondono in modo diverso alle prove, si devono fornire elementi attestanti che il ceppo selezionato presenta fecondità e reattività adeguate. Se si utilizzano altre specie occorre documentarne l'attendibilità e la sensibilità dal punto di vista della determinazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

8. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C ($\pm$ 3 °C). L'umidità relativa deve mantenersi intorno al 50-60 %; in ogni caso non è inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12:12 (luce/buio). È anche possibile invertire il fotoperiodo prima dell'accoppiamento e per tutta la durata dello studio, al fine di verificare gli endpoint funzionali e comportamentali durante il periodo di oscurità (con luce rossa), ossia nel periodo di normale attività degli animali (22). Qualsiasi modifica del fotoperiodo deve prevedere un periodo di acclimatazione sufficiente perché gli animali possano adattarsi. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. È necessario indicare nella relazione il tipo di cibo e d'acqua e analizzare entrambi per ricercare la presenza di contaminanti.
9. Gli animali possono essere alloggiati individualmente o in piccoli gruppi dello stesso sesso. L'accoppiamento va effettuato in gabbie adeguate allo scopo. Dopo che è stata comprovata l'avvenuta copulazione oppure al più tardi il 15° giorno di gestazione, le femmine fecondate sono alloggiate separatamente in gabbie apposite per il parto o la gestazione. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Quando si avvicina il momento del parto occorre fornire alle femmine gravide materiale specifico adatto per la preparazione del nido. È noto che una manipolazione inadeguata o condizioni di stress durante la gravidanza possono provocare effetti indesiderati, compreso un aborto o uno sviluppo fetale o postnatale alterato. Per evitare la mortalità fetale dovuta a fattori che non dipendono dall'esposizione alla sostanza in esame, gli animali vanno maneggiati con cautela durante la gravidanza, evitando di sottoporli a stress causato da fattori esterni, come ad esempio l'eccessivo rumore.

Preparazione degli animali

10. Si utilizzano animali sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio e non siano stati sottoposti a precedenti procedure sperimentali, a meno che lo studio faccia parte di un altro studio (cfr. paragrafo 3). Gli animali sperimentali devono essere caratterizzati sotto il profilo di specie, ceppo, provenienza, sesso, peso ed età. Ogni animale riceve un numero di identificazione unico, con il quale viene marchiato. Gli animali di tutti i gruppi sperimentali devono essere, per quanto possibile, uniformi per età e peso e rientrare nella gamma normale di valori della specie e del ceppo studiati. Per ciascun livello di dose si utilizzano giovani femmine adulte nullipare. I fratelli e le sorelle non vanno fatti accoppiare e occorre prendere precauzioni in tal senso. Il giorno di gestazione (GG) 0 è quello in cui si osserva un tappo vaginale e/o la presenza di sperma. Quando si acquistano da un fornitore femmine gravide di cui è nota l'età gestazionale, si deve prevedere un periodo adeguato di acclimatazione (ad esempio, 2-3 giorni). Le femmine fecondate sono assegnate a caso ai gruppi di controllo e di trattamento in modo da risultare, nella misura del possibile, in egual numero in ciascun gruppo (ad esempio, per ottenere una distribuzione uniforme, si raccomanda di utilizzare una procedura casuale stratificata, come quella basata sul peso corporeo). Anche il numero di femmine fecondate dallo stesso maschio deve essere uniforme nei vari gruppi.

PROTOCOLLO

Numero e sesso degli animali

11. In ciascun gruppo di trattamento e di controllo il numero di femmine gravide da esporre alla sostanza in esame deve essere sufficiente a garantire che i discendenti siano in numero adeguato a valutare la neurotossicità. Si raccomandano 20 nidiata per ciascun livello di dose. È possibile utilizzare modelli di somministrazione delle dosi con repliche e a gruppi scaglionati se si raggiunge il numero totale previsto di nidiata per gruppo e se si utilizzano modelli statistici adatti a tenere conto delle repliche.
12. Al più tardi il quarto giorno dalla nascita (PND 4, il giorno del parto corrisponde a PND 0) occorre regolare le dimensioni delle nidiata eliminando in modo aleatorio i piccoli in eccesso, in modo da portare tutte le nidiata a numero uguale (23), avendo cura che ciascuna di esse non superi la dimensione media della nidiata per il ceppo di roditori utilizzato (8-12). Ogni nidiata deve contenere, nella misura del possibile, lo stesso numero di maschi e femmine. Non è ammessa l'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio, in base al peso corporeo. Dopo la standardizzazione delle nidiata (mediante eliminazione dei piccoli soprannumerari) e prima di analizzare gli endpoint funzionali, occorre identificare in modo univoco, con metodi non cruenti (cfr. nota 24), ogni piccolo che si prevede di sottoporre a prove pre o post svezzamento.

Assegnazione degli animali alle prove funzionali e comportamentali, alla determinazione del peso del cervello e alla valutazione neuropatologica

13. Il presente metodo di prova consente di scegliere in vari modi gli animali esposti in utero e via allattamento da destinare alle prove funzionali e comportamentali, agli esami della maturazione sessuale, alla determinazione del peso del cervello e alla valutazione neuropatologica (25). È possibile aggiungere altre prove sulla funzione neuro-comportamentale (ad esempio, il comportamento sociale), sulla neurochimica o sulla neuropatologia, valutando caso per caso e a condizione che non sia compromessa l'integrità delle prove originariamente richieste.
14. In ogni gruppo-dose si scelgono i piccoli da assegnare alle prove per l'esame degli endpoint a partire dal quarto giorno dopo la nascita (PND 4). La selezione dei piccoli deve essere effettuata in modo che, per quanto possibile, in tutte le prove siano egualmente rappresentati entrambi i sessi di ciascuna nidiata in ciascun gruppo-dose. Nella prova dell'attività motoria si deve esaminare la stessa coppia di maschi e femmine in tutte le fasce di età anteriori allo svezzamento (cfr. punto 35). Per tutte le altre prove, si può destinare alle varie prove comportamentali la stessa coppia o coppie diverse. È talvolta necessario destinare piccoli diversi alle prove della funzione cognitiva in cui si mettono a confronto animali appena svezzati e adulti, per evitare di confondere nelle misurazioni gli effetti dovuti all'età e quelli riconducibili all'esperienza acquisita (26)(27). Al momento dello svezzamento (PND 21), i piccoli che non sono selezionati per le prove possono essere sacrificati con metodi non cruenti. Le eventuali modifiche dell'assegnazione dei piccoli devono essere indicate nella relazione. L'unità statistica di misura è la nidiata (o la madre) e non il figlio.
15. Vi sono diversi modi per assegnare i piccoli agli esami pre e post svezzamento, alle prove cognitive, agli esami patologici ecc. (cfr. figura 1 per lo schema generale e appendice 1 per alcuni esempi di assegnazione). Di seguito è indicato il numero minimo consigliato di animali in ciascun gruppo-dose per gli esami pre e post svezzamento:

Osservazioni cliniche e peso corporeo	Tutti gli animali
Osservazioni cliniche dettagliate	20/sesso (1/sesso/nidiata)
Peso del cervello (post fissazione) PND 11-22	10/sesso (1/nidiata)
Peso del cervello (non fissato) ~ PND 70	10/sesso (1/nidiata)
Neuropatologia (fissazione per immersione o perfusione) PND 11-22	10/sesso (1/nidiata)
Neuropatologia (fissazione per perfusione) PND ~70	10/sesso (1/nidiata)

Maturazione sessuale	20/sexo (1/sexo/nidiata)
Altri indicatori di sviluppo (facoltativo)	Tutti gli animali
Ontogenesi comportamentale	20/sexo (1/sexo/nidiata)
Attività motoria	20/sexo (1/sexo/nidiata)
Funzione motoria e sensoriale	20/sexo (1/sexo/nidiata)
Apprendimento e memoria	10/sexo ^(a) (1/nidiata)

^(a) Secondo la sensibilità delle prove della funzione cognitiva, può essere necessario esaminare un numero maggiore di animali, ad esempio, 1 maschio e 1 femmina per nidiata (per l'assegnazione degli animali alle prove, si veda l'appendice 1). Per ulteriori indicazioni sulle dimensioni del campione, si veda il documento d'orientamento dell'OCSE 43 (8).

Dosaggio

16. Si utilizzano almeno tre diversi livelli di dose e un controllo parallelo. La somministrazione dei vari livelli di dose deve essere distanziata in modo che gli effetti tossici siano gradualmente. A meno che non vi siano limiti imposti dalla natura fisico-chimica o dalle proprietà biologiche della sostanza chimica in esame, si sceglie come dose più elevata il livello che induce un certo grado di tossicità nella madre (che si manifesta, ad esempio, in segni clinici, rallentamento dell'aumento del peso — non superiore al 10 % — e/o segnali evidenti di tossicità dose-limitante in un organo bersaglio). La dose più elevata non deve essere superiore a 1 000 mg per kg di peso corporeo al giorno, con qualche eccezione, ad esempio, nel caso in cui l'esposizione umana prevista alla sostanza in esame indichi la necessità di utilizzare una dose maggiore. In alternativa, è possibile determinare il dosaggio massimo da utilizzare per ottenere una tossicità minima nella madre mediante studi pilota o studi preliminari di definizione del range di dosi. Se la sostanza chimica in esame si è dimostrata tossica per lo sviluppo in uno studio standard di tossicità per lo sviluppo o in uno studio pilota, il livello più elevato dovrà essere la dose massima priva di effetti tossici eccessivi nella progenie — né morte in utero o neonatale, né malformazioni — che precluderebbero una valutazione significativa della neurotossicità. Il livello di dose minimo deve mirare a non produrre alcun segno di tossicità, in particolare di neurotossicità, nella madre o nella fase dello sviluppo. Occorre selezionare una sequenza decrescente di livelli di dose al fine di evidenziare eventuali relazioni dose-effetto e stabilire il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi (NOAEL), oppure le dosi prossime al limite di rivelabilità che consentano di determinare una dose di riferimento. L'intervallo ottimale tra dosi consecutive è definito da un fattore compreso fra due e quattro; spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo sperimentale per evitare intervalli molto ampi (ad esempio, di un fattore di oltre il 10).
17. I livelli di dose vanno selezionati tenendo conto degli eventuali dati esistenti sulla tossicità, oltre alle informazioni sul metabolismo e sulla tossicocinetica della sostanza in esame o di materiali ad essa correlate. Tali dati possono contribuire altresì a dimostrare l'adeguatezza dello schema di somministrazione delle dosi. La somministrazione diretta delle dosi ai piccoli va ponderata in funzione delle informazioni relative all'esposizione e ai dati farmacocinetici (28)(29). Prima di condurre studi che prevedono la somministrazione diretta a cuccioli occorre valutarne attentamente i pro e i contro (30).
18. Il gruppo di controllo parallelo deve essere trattato con un placebo oppure, se si utilizza un mezzo disperdente per somministrare la sostanza in esame, trattato col solo mezzo disperdente. A tutti gli animali deve di norma essere somministrato lo stesso volume di sostanza o di mezzo disperdente in base al peso corporeo. In caso venga utilizzato un mezzo disperdente o un altro additivo per facilitare la somministrazione delle dosi, occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del mezzo disperdente o dell'additivo: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza chimica in esame, effetti sulle sue proprietà chimiche che possono alterarne le caratteristiche tossiche ed effetti sul consumo di cibo o acqua oppure sullo stato nutrizionale degli animali. Il mezzo disperdente non deve causare effetti che possono interferire con l'interpretazione dello studio, non essere tossico dal punto di vista del neurocomportamento, né incidere sulla riproduzione o sullo sviluppo. Per quanto riguarda i nuovi veicoli, oltre al gruppo di controllo trattato con il solo mezzo disperdente, è necessario includere un gruppo di controllo trattato con un placebo. Gli animali del o dei gruppi di controllo devono essere manipolati esattamente come quelli dei gruppi esposti alla sostanza in esame.

Somministrazione delle dosi

19. La via di esposizione attraverso cui somministrare la sostanza chimica in esame o il mezzo disperdente è scelta in funzione della potenziale via d'esposizione umana e in base alle informazioni disponibili sul metabolismo e sulla distribuzione negli animali sperimentali. La via di somministrazione è in genere orale (ad esempio, mediante una sonda gastrica, la dieta o l'acqua da bere), ma sono ammesse anche altre vie (ad esempio, cutanea o per inalazione), in base alle caratteristiche e alle vie di esposizione umana note o prevedibili [per ulteriori informazioni, si veda il documento di orientamento 43 (8)]. È necessario giustificare la scelta della via di somministrazione. La sostanza in esame va somministrata ogni giorno all'incirca alla stessa ora.
20. Di norma la dose somministrata ai singoli animali si calcola in base all'ultima determinazione del peso corporeo individuale. Occorre tuttavia regolare con grande attenzione le dosi durante l'ultimo trimestre di gravidanza. Le madri in cui si dovessero osservare effetti di eccessiva tossicità vanno sopresse con metodi non cruenti.
21. La sostanza in esame o il mezzo disperdente sono somministrati alle femmine fecondate almeno una volta al giorno, dal momento dell'impianto (GD 6) fino a tutto il periodo della lattazione (PND 21), affinché i figli siano esposti alla sostanza durante lo sviluppo neurologico pre e postnatale. L'età alla quale iniziare a somministrare le dosi, così come la durata e la frequenza della somministrazione, possono essere modificate se emergono elementi comprovanti che un altro disegno sperimentale corrisponde meglio all'esposizione umana. Se si utilizzano altre specie occorre regolare la durata della somministrazione per garantire un'esposizione durante tutti i periodi iniziali di sviluppo del cervello (vale a dire, equivalenti alla crescita prenatale e postnatale iniziale del cervello umano). La somministrazione può cominciare all'inizio della gestazione (GD 0), sebbene sia opportuno tener conto del fatto che la sostanza in esame può provocare la perdita dell'embrione prima dell'impianto. Questo rischio può essere evitato iniziando la somministrazione al sesto giorno (GD 6), scelta che però esclude dal trattamento le fasi di sviluppo comprese tra il GD 0 e 6. Quando il laboratorio acquista animali già fecondati, è impossibile iniziare il trattamento il GD 0, nel qual caso il GD 6 è una buona soluzione per la scelta del giorno di inizio della somministrazione. Il laboratorio decide lo schema di somministrazione delle dosi in base alle informazioni di cui dispone sugli effetti della sostanza in esame, alla propria esperienza e a considerazioni di tipo logistico, che possono anche portare a prolungare la somministrazione fin dopo lo svezzamento. È necessario interrompere la somministrazione il giorno del parto nelle femmine che non hanno ancora dato alla luce tutti i figli. In genere si ritiene che la progenie sia esposta attraverso il latte materno; si deve, tuttavia, considerare l'esposizione diretta dei piccoli se non è comprovata la loro esposizione continua. Prove dell'esposizione continua possono essere ricavate da, ad esempio, informazioni farmacocinetiche, tossicità nella progenie oppure modifiche dei biomarcatori (28).

OSSERVAZIONI**Osservazioni sulle madri**

22. Tutte le madri sono accuratamente esaminate almeno una volta al giorno per verificare le condizioni di salute, comprese la morbidità e la mortalità.
23. Durante i periodi di trattamento e di osservazione si devono effettuare periodicamente esami clinici più approfonditi (almeno due volte nel periodo di somministrazione durante la gestazione e due volte nel periodo di somministrazione durante la lattazione), utilizzando almeno dieci madri per ogni livello di dose. L'osservazione è eseguita, fuori dalla gabbia di stabulazione, da tecnici specializzati che non conoscono il trattamento cui sono sottoposti gli animali e applicano protocolli standard per ridurre al minimo lo stress degli animali, limitare il più possibile il condizionamento dell'osservatore e massimizzare l'attendibilità tra osservatori. Ove possibile, è preferibile che le osservazioni in un determinato studio siano effettuate dallo stesso tecnico.
24. I segni osservati devono essere riportati nella relazione, specificandone anche l'entità, ogniquale volta sia possibile. Tra le osservazioni cliniche devono rientrare tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi e delle mucose, la comparsa di secrezioni e l'attività autonoma (ad esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito e/o respirazione attraverso la bocca, anomalie nella minzione o nella defecazione).
25. Deve essere indicata nella relazione anche ogni risposta inusuale riguardante la posizione del corpo, il livello di attività (ad esempio maggiore o minore esplorazione della zona standard) e la coordinazione dei movimenti. Devono essere inoltre registrate le modificazioni dell'andatura (ad esempio andatura anserina, atassia), della postura (ad esempio gobba) e della reattività alla manipolazione, al posizionamento o ad altri stimoli ambientali, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, convulsioni o tremori, stereotipie (ad esempio toelettatura eccessiva, movimenti inusuali della testa, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (ad esempio tendenza a mordere o tendenza eccessiva a leccarsi, automutilazione, marcia a ritroso, vocalizzazione) o aggressivi.

26. I segni di tossicità vanno indicati nella relazione, insieme al giorno della loro insorgenza, ora del giorno, grado e durata.
27. Gli animali sono pesati al momento della somministrazione delle dosi almeno una volta alla settimana durante tutto lo studio, il giorno del parto o in prossimità di tale giorno e il giorno dello svezzamento (PND 21). Negli studi con sonda gastrica le madri sono pesate almeno con cadenza bisettimanale. Le dosi devono essere eventualmente regolate al momento di ogni pesata. Il consumo di cibo va misurato almeno con cadenza settimanale durante la gestazione e la lattazione. Il consumo di acqua va misurato almeno con cadenza settimanale se gli animali sono esposti alla sostanza in esame attraverso l'acqua.

Osservazioni sulla progenie

28. Tutta la progenie è esaminata accuratamente almeno una volta al giorno per rilevare i segni di tossicità e determinare la morbilità e la mortalità.
29. Durante i periodi di trattamento e di osservazione si devono effettuare esami clinici più approfonditi. L'osservazione della progenie (almeno un piccolo/sexo/nidiata) è eseguita da tecnici specializzati che non conoscono il trattamento cui sono sottoposti gli animali e applicano protocolli standard per ridurre al minimo il condizionamento dell'osservatore e massimizzare l'attendibilità tra osservatori. Ove possibile, è preferibile che le osservazioni siano effettuate dallo stesso tecnico. Si controllano almeno gli effetti descritti nei paragrafi 24 e 25, applicabili alla fase di sviluppo in osservazione.
30. Tutti i segni di tossicità vanno indicati nella relazione, insieme al giorno della loro insorgenza, ora del giorno, grado e durata.

Indicatori fisici e dello sviluppo

31. I cambiamenti degli indicatori dello sviluppo prima dello svezzamento (quali il dispiegamento del padiglione auricolare, l'apertura degli occhi, l'eruzione degli incisivi) sono strettamente correlati al peso corporeo (30)(31), che può pertanto costituire il miglior indicatore dello sviluppo fisico. La misurazione degli indicatori di sviluppo è consigliabile quindi solo quando è comprovata l'utilità di tali dati. Il calendario per la verifica di questi parametri è indicato nella tabella 1. In funzione degli effetti previsti e dei risultati delle misurazioni iniziali, può essere consigliabile aggiungere altre date o effettuare le misurazioni in altre fasi dello sviluppo.
32. Quando si esamina lo sviluppo fisico è preferibile riferirsi all'età postcoitale anziché a quella postnatale (33). Se la progenie è sottoposta a prova il giorno dello svezzamento, si raccomanda di eseguire la prova prima dello svezzamento vero e proprio, per evitare che lo stress associato a questo evento falsi la lettura degli effetti. Inoltre, gli esami della progenie da realizzarsi dopo lo svezzamento non si devono effettuare nei due giorni immediatamente successivi.

Tabella 1

Calendario per l'esame degli indicatori fisici e dello sviluppo, e degli endpoint funzionali/comportamentali ^(a)

Endpoint \ Età	Pre svezzamento ^(b)	Adolescenza ^(b)	Giovani adulti ^(b)
Indicatori fisici e dello sviluppo			
Peso corporeo e osservazioni cliniche	Settimanalmente ^(c)	almeno ogni due settimane	almeno ogni due settimane
Peso del cervello	PND 22 ^(d)		alla fine
Neuropatologia	PND 22 ^(d)		alla fine
Maturazione sessuale	—	se opportuno	—
Altri indicatori dello sviluppo ^(e)	se opportuno	—	—

Endpoint \ Età	Pre svezzamento ^(b)	Adolescenza ^(b)	Giovani adulti ^(b)
Endpoint funzionali/comportamentali			
Ontogenesi comportamentale	almeno due misurazioni		
Attività motoria (incluso l'adattamento)	1-3 volte ^(f)	—	una volta
Funzione motoria e sensoriale	—	una volta	una volta
Apprendimento e memoria	—	una volta	una volta

^(a) Questa tabella indica il numero minimo di misurazioni da eseguire. In funzione degli effetti previsti e dei risultati delle misurazioni iniziali, può essere consigliabile aggiungere altre date (ad esempio, animali vecchi) o effettuare le misurazioni in altre fasi dello sviluppo.

^(b) Si raccomanda di sospendere le prove sulla progenie nei due giorni successivi allo svezzamento (cfr. paragrafo 23). Date consigliate per le prove sugli adolescenti: PND 25 ± 2, per l'apprendimento e la memoria; PND 25 ± 2 per la funzione motoria e sensoriale. Date consigliate per le prove sui giovani adulti: PND 60-70.

^(c) Il peso corporeo deve essere misurato almeno due volte alla settimana quando la sostanza chimica è somministrata direttamente ai piccoli, in modo da regolare le dosi in base al rapido aumento ponderale che caratterizza questa fase.

^(d) Se necessario, la pesatura del cervello e l'esame della neuropatologia possono essere effettuati prima (ad esempio, PND 11) (cfr. paragrafo 39).

^(e) Occorre riportare nella relazione le misurazioni degli altri indicatori dello sviluppo eventualmente considerati oltre al peso corporeo (ad esempio, l'apertura degli occhi) (cfr. paragrafo 31).

^(f) Cfr. paragrafo 35.

33. Si procede alla conta e all'identificazione del sesso dei piccoli vivi, quest'ultima effettuata tramite esame visivo o misurazione della distanza anogenitale (34)(35); ogni piccolo è pesato individualmente alla nascita o immediatamente dopo, almeno una volta alla settimana durante l'allattamento e successivamente almeno una volta ogni due settimane. Per valutare la maturazione sessuale, si determina l'età e il peso corporeo di almeno un maschio e una femmina per lettiera quando si osserva la comparsa dell'apertura vaginale (36) o della separazione prepuziale (37).

Ontogenesi comportamentale

34. L'ontogenesi di determinati comportamenti è misurata in almeno un piccolo/sesso/lettiera nel periodo corrispondente all'età prescelta, utilizzando gli stessi piccoli in tutte le date stabilite per le misurazioni e per tutti i comportamenti esaminati. I giorni in cui si effettuano le misurazioni devono essere separati da intervalli regolari per definire se il cambiamento dell'ontogenesi di un determinato comportamento è normale oppure è legato al trattamento (38). Tra i comportamenti di cui si può esaminare l'ontogenesi indichiamo, a titolo di esempio, il riflesso di raddrizzamento, la geotassia negativa e l'attività motoria (38)(39)(40).

Attività motoria

35. L'attività motoria deve essere monitorata (41)(42)(43)(44)(45) nel periodo che precede lo svezzamento e nell'età adulta. Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. La durata della sessione di prova deve essere tale da consentire di dimostrare l'adattamento intra-sessione dei controlli non trattati. È vivamente raccomandato di usare l'attività motoria per esaminare l'ontogenesi comportamentale. In una prova di ontogenesi comportamentale, gli animali utilizzati nelle sessioni di prova prima dello svezzamento devono essere sempre gli stessi. La frequenza delle prove deve essere tale da consentire di esaminare l'ontogenesi dell'adattamento intra-sessione (44). A tale scopo, fino al giorno dello svezzamento incluso, possono essere necessarie tre o più sessioni di prova (ad esempio, PND 13, 17, 21). Si devono poi esaminare gli stessi animali, o altri componenti della stessa nidiata, anche in età adulta verso la fine dello studio (ad esempio, PND 60-70). Se necessario, è possibile aggiungere sessioni di prova in altre date. L'attività motoria va controllata tramite un apparecchio di registrazione automatica, in grado di rilevarne sia l'aumento che la diminuzione (ciò vuol dire che il livello dell'attività di partenza misurata dall'apparecchio non deve essere così basso da escludere la possibilità di rilevarne la diminuzione, né così alto da impedire di rilevarne l'aumento). Tutti gli apparecchi vengono testati secondo protocolli standard per assicurare, nella misura del possibile, l'affidabilità inter-apparecchio e inter-sessione. I diversi gruppi di trattamento devono essere assegnati ai vari apparecchi nel modo più equilibrato possibile. Ogni animale è

sottoposto a prova separatamente. I gruppi di trattamento vanno ripartiti sull'arco della giornata per tener conto dei ritmi circadiani di attività. Si cercherà in particolar modo di ridurre al minimo le variazioni delle condizioni sperimentali assicurandosi che non avvengano sistematicamente durante la somministrazione della sostanza. Tra le variabili che possono influire su molte misurazioni del comportamento, ivi compresa l'attività motoria, vi sono il livello sonoro, le dimensioni e la forma della gabbia, la temperatura, l'umidità relativa, l'illuminazione, gli odori, l'uso della gabbia di stabulazione o di una nuova gabbia e le distrazioni legate all'ambiente.

Funzione motoria e sensoriale

36. La funzione motoria e sensoriale deve essere esaminata accuratamente almeno una volta negli animali adolescenti e una volta nei giovani adulti (ad esempio, PND 60-70). Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. Il numero di prove condotte deve essere sufficiente a garantire un campionamento quantitativo adeguato delle modalità sensoriali (ad esempio, somato-sensoriale, vestibolare) e delle funzioni motorie (ad esempio, forza, coordinamento). Alcuni esempi di prove per valutare la funzione motoria e sensoriale: riflesso di spinta estensorio (46), riflesso di raddrizzamento (47)(48), calo del riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) e potenziali evocati (55).

Prove di apprendimento e memoria

37. Una prova di apprendimento associativo e di memoria deve essere condotta dopo lo svezzamento (ad esempio, 25 ± 2 giorni) e nei giovani adulti (PND 60 e oltre). Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. È possibile utilizzare le stesse prove o prove diverse per queste due fasi dello sviluppo. La scelta della o delle prove di apprendimento e memoria nei ratti svezzati e negli adulti è relativamente libera, purché si rispettino due criteri: in primo luogo, l'apprendimento deve essere esaminato osservando il cambiamento che avviene nel corso di ripetute prove o sessioni, oppure, per le prove che comportano un'unica sessione, con riferimento ad una condizione sperimentale che controlla gli effetti non associativi dell'esperienza di apprendimento; in secondo luogo, la o le prove devono includere una misurazione della memoria (a breve o lungo termine), oltre all'apprendimento iniziale (acquisizione), misurazione che però non può essere indicata nella relazione se non è accompagnata dalla misurazione dell'acquisizione ottenuta nella stessa prova. Se la o le prove di apprendimento e memoria dimostrano un effetto della sostanza chimica in esame, si può considerare il ricorso ad altre prove per escludere qualsiasi interpretazione fondata sulle alterazioni delle capacità sensoriali, motivazionali e/o motorie. Oltre a questi due criteri, si raccomanda che la scelta della prova di apprendimento e memoria si basi sulla comprovata sensibilità alla classe di sostanze chimiche in esame, sempre che tale informazione sia ricavabile dalla letteratura. Se non lo fosse, tra le prove che soddisfano i criteri summenzionati rientrano le seguenti: evitamento passivo (43)(56)(57), memoria spaziale associata al riconoscimento della posizione (Delayed-Matching-To-Position) per il ratto adulto (58) e per il neonato (59), condizionamento olfattivo (43)(60), labirinto acquatico di Morris (61)(62)(63), labirinto di Biel o Cincinnati (64)(65), labirinto a bracci radiali (66), labirinto a T (43), e acquisizione e ritenzione di un comportamento programmato (26)(67)(68). Altre prove descritte in letteratura si applicano ai ratti svezzati (26)(27) e agli adulti (19)(20).

Esame autotico

38. Le madri possono essere sottoposte a eutanasia dopo lo svezzamento della progenie.
39. La valutazione neuropatologica della progenie è eseguita sui tessuti degli animali soppressi con metodi non cruenti al ventiduesimo giorno dalla nascita (PND 22) o prima, in un giorno compreso tra PND 11 e PND 22, e al termine dello studio. I tessuti da esaminare negli animali sacrificati fino al PND 22 sono quelli cerebrali, mentre negli animali sacrificati alla fine sono sia i tessuti del sistema nervoso centrale (Snc) sia quelli del sistema nervoso periferico (SNP). Gli animali sacrificati il PND 22 o prima possono essere fissati per immersione o perfusione. Gli animali sacrificati al termine dello studio sono fissati per perfusione. Tutti gli aspetti della preparazione dei campioni tissutali, dalla perfusione degli animali alla dissezione dei campioni di tessuto, al trattamento dei tessuti, alla colorazione dei vetrini, devono seguire un modello sperimentale equilibrato, in cui ciascun lotto contiene una quantità di campioni rappresentativi di ogni gruppo-dose. Informazioni supplementari sulla neuropatologia si trovano nel documento di orientamento dell'OCSE n. 20 (9), e anche in (103).

Trattamento dei campioni di tessuto

40. Si registrano tutte le anomalie macroscopiche osservate al momento dell'autopsia. I campioni di tessuto prelevati devono essere rappresentativi di tutte le regioni principali del sistema nervoso. Vanno conservati in un fissativo adatto e trattati in base a protocolli istologici standard pubblicati (69)(70)(71)(103). L'inclusione in paraffina per i tessuti del sistema nervoso centrale e di quello periferico è indicata, ma l'uso di osmio nella post fissazione oppure l'inclusione in una resina sintetica possono risultare mezzi più adatti quando è richiesto un grado più alto di risoluzione (ad esempio, per nervi periferici, qualora si sospetti una neuropatia periferica, e/o per l'analisi

morfometrica dei nervi periferici). I tessuti cerebrali prelevati ai fini dell'analisi morfometrica devono essere inclusi in un mezzo adatto, simultaneamente per tutti i livelli di dose, per evitare la coartazione, artefatto che può insorgere durante la conservazione prolungata nel fissativo (6).

Esame neuropatologico

41. Le finalità dell'esame qualitativo sono le seguenti:

- i) individuare le regioni del sistema nervoso che presentano segni inequivocabili di alterazioni neuropatologiche,
- ii) individuare i tipi di alterazioni neuropatologiche derivanti dall'esposizione alla sostanza chimica in esame; e
- iii) determinare la gravità delle alterazioni neuropatologiche.

La ricerca delle alterazioni neuropatologiche è effettuata da un patologo debitamente formato mediante esame al microscopio di sezioni istologiche rappresentative dei campioni di tessuto. Ogni alterazione deve essere classificata assegnandole un livello di gravità soggettivo. Una colorazione con ematossilina ed eosina spesso è sufficiente per esaminare le sezioni cerebrali degli animali sacrificati il PND 22 o prima. Tuttavia, per le sezioni dei tessuti del sistema nervoso centrale e periferico prelevati da animali sacrificati al termine dello studio è raccomandata una colorazione per l'evidenziazione della mielina (ad esempio, luxol fast blu o cresil violetto) e un'impregnazione argentea (ad esempio, metodi di Bielschowsky o di Bodian). Spetta al patologo, in base alla propria esperienza e alla natura delle alterazioni osservate, decidere se utilizzare altre colorazioni per individuare e caratterizzare tipi di alterazioni particolari [ad esempio, proteina acida fibrillare della glia o istochimica della lectina per verificare le alterazioni gliali e microgliali (72), fluoro-jade per rilevare le necrosi (73) (74) o impregnazioni argentiche specifiche per le degenerazioni neurali (75)].

42. È utile eseguire una valutazione morfometrica (quantitativa), poiché i dati che se ne ricavano possono servire a rilevare un effetto causato dal trattamento e ad interpretare le differenze di peso o morfologia del cervello ascrivibili al trattamento (76)(77). Si prelevano campioni di tessuto nervoso e li si prepara per la valutazione morfometrica, che può consistere, ad esempio, in misurazioni lineari e della superficie di determinate regioni del cervello (78). Entrambe queste misurazioni si praticano su sezioni omologhe attentamente selezionate in base a indicatori microscopici affidabili (6). Il ricorso alla stereologia è utile per identificare gli effetti del trattamento su parametri quali il volume o il numero di cellule di determinate regioni neuroanatomiche (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. L'esame cerebrale è teso a individuare qualsiasi segno manifesto di alterazioni neuropatologiche dovute al trattamento, su campioni prelevati all'uopo da tutte le principali regioni cerebrali (ad esempio, bulbi olfattivi, corteccia cerebrale, ippocampo, gangli basali, talamo, ipotalamo, mesencefalo — tetto, tegmento e peduncoli cerebrali —, ponte, midollo allungato, cervelletto), in modo da garantire un esame il più completo possibile. È importante che le sezioni siano prelevate nello stesso piano in tutti gli animali. Negli adulti sottoposti ad eutanasia al termine dello studio si prelevano sezioni rappresentative del midollo spinale e del sistema nervoso periferico. Le zone esaminate devono comprendere l'occhio, con il nervo ottico e la retina, il midollo spinale a livello del rigonfiamento lombare e di quello cervicale, le fibre della radice dorsale e ventrale, il nervo sciatico prossimale, il nervo tibiale prossimale (a livello del ginocchio) e la ramificazione del nervo tibiale a livello dei muscoli del polpaccio. Per il midollo spinale e il nervo periferico, le sezioni devono essere sia trasversali che longitudinali.

44. La valutazione neuropatologica deve includere la ricerca di segni di danni a carico del sistema nervoso (6)(85)(86)(87)(88)(89), come pure di alterazioni cellulari (quali vacuolizzazione neuronale, degenerazioni, necrosi) e modificazioni tissutali (quali gliosi, infiltrazione leucocitaria, formazione di cisti). A questo proposito, è importante distinguere gli effetti dovuti al trattamento dagli eventi normali dello sviluppo che notoriamente avvengono nella fase corrispondente all'età dell'animale al momento del sacrificio (90). Di seguito si elencano, a titolo illustrativo, alcune alterazioni significative che sono indice di danno verificatosi nel corso dello sviluppo:

- alterazioni delle dimensioni macroscopiche o della forma dei bulbi olfattivi, del cervello o del cervelletto,
- alterazioni delle dimensioni relative di varie regioni del cervello, in particolare aumento o diminuzione dovuti alla perdita o alla persistenza di popolazioni normalmente transitorie di cellule o a proiezioni assonali (ad esempio, strato germinativo esterno del cervelletto, corpo calloso),
- alterazioni della proliferazione, migrazione e differenziazione, rivelate da zone di apoptosi o necrosi eccessiva, popolazioni raggruppate o disperse di neuroni mal orientati o malformati oppure alterazioni delle dimensioni relative di vari strati delle strutture corticali,

- alterazioni dei modelli di mielinizzazione, in particolare la riduzione delle dimensioni complessive delle strutture mielinate o modifica della loro colorazione,
- segni manifesti di idrocefalia, in particolare ingrossamento dei ventricoli, stenosi dell'acquedotto di Silvio e assottigliamento degli emisferi cerebrali.

Analisi della relazione tra le alterazioni neuropatologiche e la dose

45. Il seguente protocollo è raccomandato per le analisi neuropatologiche qualitative e quantitative. Si inizia col mettere a confronto le sezioni del gruppo trattato con la dose elevata e quelle del gruppo di controllo. Se non si riscontrano alterazioni neuropatologiche negli animali del gruppo trattato con la dose elevata, non occorre effettuare ulteriori analisi. In caso contrario, si procede all'esame degli animali trattati con le dosi intermedie e basse. Se lo studio sul gruppo trattato con la dose elevata è interrotto a causa del decesso degli animali o di effetti tossici di diversa natura non associati alla sostanza in esame, si ricercano allora alterazioni neuropatologiche nei gruppi trattati con le dosi intermedie e basse. Se si rilevano segni di neurotossicità nei gruppi trattati con le dosi più basse, occorre sottoporre questi gruppi all'analisi neuropatologica. Se dall'esame qualitativo e quantitativo risultano alterazioni neuropatologiche dovute al trattamento, occorre determinare in che misura l'incidenza, la frequenza e il livello di gravità delle lesioni o delle alterazioni morfometriche dipendono dalla dose (dose-dipendenza), in base alla valutazione di tutti gli animali di tutti i gruppi trattati. Tutte le regioni del cervello che presentano qualsiasi segno di alterazione neuropatologica devono essere incluse in questa valutazione. Occorre descrivere, per ciascun tipo di lesione, le caratteristiche su cui si basano i diversi livelli di gravità, indicando i criteri utilizzati per distinguerli. Si registra la frequenza e il livello di gravità di ciascun tipo di lesione e si effettua un'analisi statistica per valutare la natura della relazione dose-risposta. Si raccomanda l'uso di vetrini codificati (91).

DATI E RELAZIONE

Dati

46. I dati, riferiti separatamente e riassunti sotto forma di tabella, devono indicare per ogni singolo gruppo sperimentale i tipi di alterazioni e il numero delle madri, dei discendenti per sesso e delle nidiade che presentano ciascun tipo di alterazione. Se è stata eseguita un'esposizione diretta postnatale della progenie, occorre indicare la via, la durata e il periodo di esposizione.

Analisi e interpretazione dei risultati

47. L'obiettivo di uno studio della neurotossicità nella fase dello sviluppo è di fornire informazioni sugli effetti dell'esposizione ripetuta a una sostanza chimica durante lo sviluppo in utero e nella fase iniziale postnatale. Poiché lo studio evidenzia sia la tossicità generale che gli endpoint di tossicità per lo sviluppo, i risultati consentiranno di distinguere gli effetti sul neurosviluppo che si verificano in assenza di tossicità materna generale da quelli indotti solo da livelli che risultano tossici anche per le madri. La complessità delle interrelazioni tra il disegno sperimentale, l'analisi statistica e la significatività biologica dei dati esige che l'interpretazione dei dati sulla neurotossicità nella fase dello sviluppo sia avvalorata da un parere specialistico (107)(109). I risultati dello studio devono essere interpretati soppesandone la forza probante (20)(92)(93)(94). Si dovranno discutere gli eventuali tipi di effetti comportamentali o morfologici riscontrati, così come le prove della relazione dose-risposta. Questa caratterizzazione dovrà includere i dati di tutti gli studi di valutazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo, in particolare studi epidemiologici sull'uomo o rapporti di studi di casi e studi su animali sperimentali (ad esempio, dati tossicocinetici, informazioni sulla relazione struttura-attività, dati ottenuti da altri studi di tossicità). Dovrà inoltre essere stabilita la relazione tra le dosi della sostanza chimica in esame e la presenza, l'assenza, l'incidenza e la portata degli eventuali effetti neurotossici per ciascun sesso (20)(95).
48. L'analisi dei dati deve includere una discussione della significatività biologica e statistica. L'analisi statistica non deve determinare l'interpretazione, bensì fungere da strumento che serva a orientarla. L'assenza o la presenza di significatività statistica di per sé non vale a giustificare l'assenza o la presenza di effetti legati al trattamento. Per evitare eventuali falsi negativi e le difficoltà inerenti alla dimostrazione di un risultato negativo, occorre includere nella discussione dei risultati i dati storici di controllo e i dati di controllo positivi, soprattutto quando non si rileva alcun effetto ascrivibile al trattamento (102) (106). La probabilità di ottenere falsi positivi deve essere discussa alla luce dell'analisi statistica generale dei risultati (96). L'analisi deve comprendere l'eventuale relazione tra le alterazioni neuropatologiche e comportamentali osservate.

49. Tutti i risultati devono essere analizzati applicando modelli statistici adatti al disegno sperimentale (108). La scelta di un'analisi parametrica o non parametrica deve essere giustificata non solo tenendo conto di fattori quali la natura dei dati (trasformati e non) e la loro distribuzione, ma anche considerando la solidità relativa dell'analisi statistica utilizzata. L'analisi statistica deve essere scelta in base alla finalità dello studio e al suo disegno sperimentale, in modo da limitare il più possibile errori di tipo I (falsi positivi) e di tipo II (falsi negativi) (96)(97)(104)(105). Se lo studio dello sviluppo utilizza specie multipare nelle quali si sottopongono a prova svariati piccoli per nidata, il modello statistico deve tenere conto della nidata, per evitare un eccesso di errori di tipo I (98)(99)(100)(101). L'unità statistica di misura è la nidata e non il figlio e i modelli sperimentali devono essere concepiti in modo da escludere che piccoli della stessa nidata siano considerati osservazioni indipendenti. Qualsiasi endpoint misurato varie volte nello stesso soggetto deve essere analizzato mediante modelli statistici che tengano conto della non indipendenza di tali misure.

Relazione sulla prova

50. La relazione deve comprendere i seguenti dati.

Sostanza chimica in esame:

- natura fisica e, ove pertinenti, proprietà fisico-chimiche;
- dati identificativi, compresa la provenienza;
- purezza del preparato e impurità note e/o attese.

Mezzo disperdente (se del caso):

- motivazione della scelta del mezzo disperdente, se diverso dall'acqua o da una soluzione salina fisiologica.

Animali sperimentali:

- specie e ceppo utilizzati, e giustificazione se la specie scelta è diversa dal ratto;
- fornitore degli animali sperimentali;
- numero, età all'inizio della prova e sesso degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, acqua ecc.;
- peso di ciascun animale all'inizio della prova.

Condizioni sperimentali:

- criteri di selezione dei livelli di dose;
- criteri di selezione della via e del periodo di somministrazione delle dosi;
- dosi somministrate, caratteristiche del mezzo disperdente, volume e forma fisica del preparato somministrato;
- informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/incorporazione nella dieta, sulla concentrazione finale, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;
- metodo utilizzato per l'identificazione univoca delle madri e della progenie;
- descrizione dettagliata del o dei protocolli di randomizzazione utilizzati per assegnare le madri ai gruppi di trattamento, per selezionare i piccoli da eliminare dalla nidata e per assegnare quelli restanti ai gruppi sperimentali;
- modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;
- se del caso, equivalenza tra la concentrazione della sostanza chimica nel cibo, nell'acqua o inalata, espressa in ppm, e la dose effettiva, espressa in mg/kg di peso corporeo/giorno;
- condizioni ambientali,
- dettagli sul tipo di cibo e acqua (acqua di rubinetto, distillata);
- date di inizio e fine dello studio.

Protocolli di osservazione e protocolli sperimentali:

- descrizione dettagliata dei protocolli utilizzati per standardizzare le osservazioni, accompagnata dalla descrizione dei protocolli e delle definizioni operative impiegati per classificare le osservazioni;
- elenco di tutti i protocolli sperimentali utilizzati e giustificazione della loro scelta;
- descrizione particolareggiata dei protocolli comportamentali/funzionali, patologici, neurochimici o elettrofisiologici utilizzati, comprese informazioni e dettagli sugli apparecchi automatici;
- protocolli di taratura e di garanzia dell'equivalenza degli apparecchi; protocolli utilizzati per garantire la composizione equilibrata dei gruppi sottoposti al trattamento;
- breve motivazione delle decisioni che si fondano sul giudizio professionale.

Risultati (individuali e di sintesi, comprese la media e la varianza se del caso):

- numero di animali all'inizio dello studio e numero al termine dello studio;
- numero di animali e nidiati utilizzati in ciascun metodo di prova;
- numero di identificazione di ciascun animale e nidiata di provenienza;
- dimensioni della nidiata e peso medio alla nascita per sesso;
- peso corporeo e variazioni del peso corporeo, compresi peso corporeo finale delle madri e dei figli;
- dati relativi al consumo di cibo e, se del caso, di acqua (ad esempio, se la sostanza chimica in esame viene somministrata con l'acqua);
- dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, in particolare i segni di tossicità o mortalità, specificando il momento e la causa del decesso, se del caso;
- natura, gravità, durata, giorno di esordio, ora del giorno e successivo decorso delle osservazioni cliniche dettagliate;
- punteggio di ogni indicatore di sviluppo (peso, maturazione sessuale e ontogenesi comportamentale) al momento di ciascuna osservazione;
- descrizione dettagliata di tutte le osservazioni comportamentali, funzionali, neuropatologiche, neurochimiche, elettrofisiologiche per sesso, compresi gli incrementi e i decrementi rispetto ai controlli;
- reperti autoptici,
- peso del cervello
- ogni diagnosi formulata alla luce di lesioni e segni neurologici, ivi comprese malattie o condizioni spontanee;
- immagini di reperti emblematici;
- immagini a debole ingrandimento che consentono di valutare l'omologia delle sezioni utilizzate per la morfometria;
- dati sull'assorbimento e sul metabolismo, compresi dati complementari provenienti da uno studio di tossicocinetica condotto separatamente, se disponibili;
- elaborazione statistica dei risultati, compresi i modelli statistici utilizzati per l'analisi dei dati, e i risultati, indipendentemente dal fatto che siano significativi;
- elenco delle persone che hanno partecipato allo studio, specificandone la formazione professionale.

Discussione dei risultati:

- informazioni sulla relazione dose-risposta, per sesso e gruppo;
- legame tra eventuali altri effetti tossici e le conclusioni circa il potenziale neurotossico della sostanza chimica in esame, per sesso e gruppo;

- ripercussioni delle eventuali informazioni tossicocinetiche sulle conclusioni;
- analogie tra gli effetti osservati e quelli di eventuali sostanze neurotossiche note;
- dati a sostegno dell'attendibilità e della sensibilità del metodo di prova (vale a dire, dati storici di controllo e dati di controllo positivi);
- eventuale rapporto tra gli effetti neuropatologici e funzionali;
- NOAEL o dose di riferimento per madri e progenie, per sesso e gruppo.

Conclusioni:

- discussione sull'interpretazione generale dei dati basata sui risultati, che espliciti la conclusione a cui si è giunti, ossia se la sostanza chimica esaminata abbia causato o meno neurotossicità nella fase dello sviluppo, con relativo NOAEL.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.
- (2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
- (3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- (4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Miles, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
- (5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Miles, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
- (6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
- (7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.
- (8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris, July 2008. Available: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- (9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

- (14) Capitolo B.34 del presente allegato, Saggio di tossicità sulla riproduzione: una generazione.
- (15) Capitolo B.35 del presente allegato, Studio di tossicità riproduttiva a due generazioni.
- (16) Capitolo B.43 del presente allegato, Studi di neurotossicità nei roditori.
- (17) Capitolo B.31 del presente allegato, Studio di tossicità prenatale.
- (18) Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (GU L 276 del 20.10.2010, pag. 33).
- (19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Available: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- (20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Available: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm>].
- (21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- (22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
- (23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
- (24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
- (25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
- (26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- (27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- (28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- (29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
- (30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
- (31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- (32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.
- (33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
- (34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
- (35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.

- (36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
- (37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
- (38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
- (39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- (40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pagg. 67-100.
- (41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
- (42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pagg. 37-82.
- (43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
- (44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
- (45) 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: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
- (46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
- (47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
- (48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
- (49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pagg. 287-351
- (50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
- (51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pagg. 181-211.
- (52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
- (53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25-30.
- (54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
- (55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pagg. 125-145.
- (56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.

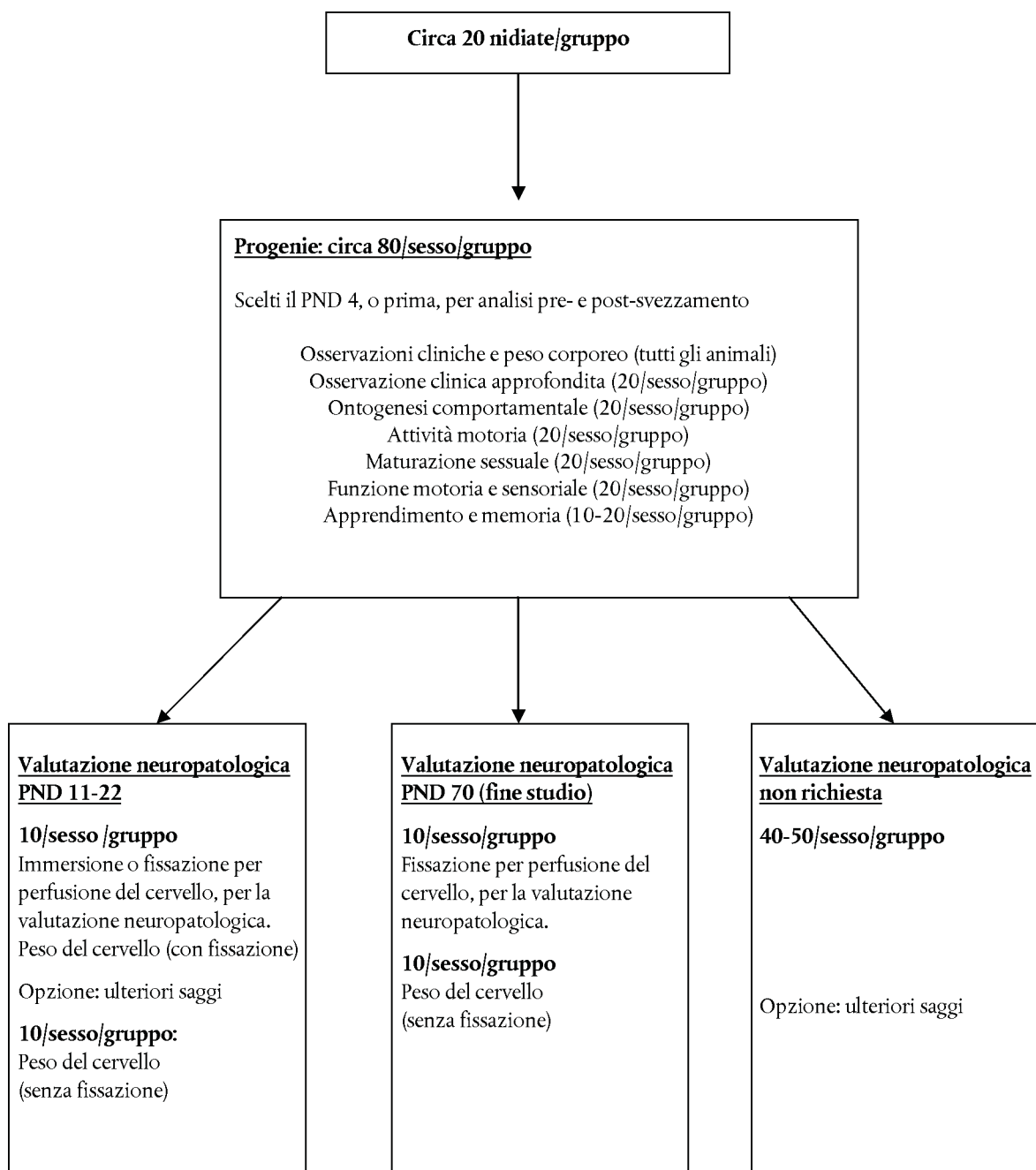
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.
- (59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
- (60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
- (61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
- (62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
- (63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60-90.
- (64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
- (65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
- (66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
- (67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
- (68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338-341.
- (69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
- (70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pagg. 84-107.
- (71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.
- (72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
- (73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123-130.
- (74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.
- (75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.

- (77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
- (78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
- (79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- (80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305-310.
- (81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262-268.
- (82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
- (83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
- (84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
- (85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113-121.
- (86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
- (87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pagg. 3-41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70-74.
- (89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056-1060.
- (90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- (91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127-133.
- (92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
- (93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.
- (94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- (95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- (96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113-126.
- (97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.

- (98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
- (99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165-172.
- (100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221-228.
- (101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
- (102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
- (103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296-313.
- (104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
- (105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295-301.
- (106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.
- (107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288-325.
- (108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.
- (109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

Figura 1

Schema generale per le prove funzionali/comportamentali, la valutazione neuropatologica e la determinazione del peso cerebrale. Questo diagramma si basa sulla descrizione di cui ai paragrafi 13-15 (PND = giorno postnatale). Alcuni esempi di suddivisione degli animali sono illustrati nell'appendice 1.



Appendice 1

1. Questa appendice contiene alcuni esempi di suddivisione degli animali, di cui si dà una descrizione e una sintesi sotto forma di tabella. Sono esempi che servono ad illustrare come l'assegnazione degli animali possa essere effettuata in vari modi nei diversi impianti sperimentali.

Esempio 1

2. Si utilizzano 20 piccoli/sexo/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per eseguire le prove pre svezzamento dell'ontogenesi comportamentale. Di questo gruppo, 10 piccoli/sexo/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti il ventiduesimo giorno dopo la nascita (PND 22). Se ne prelevano i cervelli, che sono poi pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica. Si ricavano inoltre i dati ponderali dei cervelli non fissati dei restanti 10 maschi e 10 femmine per livello di dose.
3. Si utilizzano altri 20 animali/sexo/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove funzionali/comportamentali post svezzamento (osservazioni cliniche dettagliate, attività motoria, riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro e prove della funzione cognitiva negli adolescenti) e per valutare l'età della maturazione sessuale. Di questi, 10 piccoli/sexo/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.
4. Per le prove della funzione cognitiva nei giovani adulti (ad esempio, PND 60-70), si utilizzano ulteriori 20 piccoli/sexo/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata). Di questi, 10 piccoli/sexo/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati al termine dello studio per poi prelevare e pesare il cervello.
5. I restanti 20 animali/sexo/gruppo possono essere utilizzati per eventuali prove supplementari.

Tabella 1

N. animale ^(a)		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f 10 m + 10 f	Ontogenesi comportamentale Peso cervello neuropatologia/morfometria al PND 22 Peso cervello al PND 22
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Osservazioni cliniche dettagliate Attività motoria Maturazione sessuale Funzione motoria e sensoriale Apprendimento e memoria (PND 25) Peso cervello/neuropatologia/morfometria nei giovani adulti ~PND 70
3	7	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Apprendimento e memoria (giovani adulti) Peso cervello nei giovani adulti ~ PND 70
4	8	—	Animali di riserva per sostituzioni o prove supplementari

^(a) In questo esempio le nidiata sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.

Esempio 2

6. Si utilizzano 20 piccoli/sexso/livello di dose (ad esempio, 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per eseguire le prove pre svezzamento dell'ontogenesi comportamentale. Di questi, 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti l'undicesimo giorno dopo la nascita (PND 11). Se ne prelevano i cervelli, che sono poi pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica.
7. Si utilizzano 20 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove post svezzamento (osservazioni cliniche dettagliate, attività motoria, valutazione della maturazione sessuale e della funzione motoria e sensoriale). Di questi, 10 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato, pesato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.
8. Per le prove sulla funzione cognitiva negli adolescenti e nei giovani adulti si impiegano 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata). Animali diversi sono utilizzati per le prove sulla funzione cognitiva al PND 23 e allo stadio di giovani adulti. Al termine dello studio i 10 animali/sexso/gruppo sottoposti alle prove da adulti sono sacrificati e il cervello è prelevato e pesato.
9. I restanti 20 animali/sexso/gruppo non selezionati per le prove sono sacrificati ed eliminati al momento dello svezzamento.

Tabella 2

N. animale ^(a)		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Ontogenesi comportamentale Peso cervello/neuropatologia/morfometria al PND 11
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Osservazioni cliniche dettagliate Attività motoria Maturazione sessuale Funzione motoria e sensoriale Peso cervello/neuropatologia/morfometria nei giovani adulti ~PND 70
3	7	10 m + 10 f ^(b)	Apprendimento e memoria (PND 23)
3	7	10 m + 10 f ^(b)	Apprendimento e memoria (giovani adulti) Peso cervello nei giovani adulti
4	8	—	Animali sacrificati ed eliminati al PND 21

^(a) In questo esempio le nidiata sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.

^(b) Piccoli diversi sono impiegati per le prove cognitive al PND 23 e allo stadio di giovani adulti (ad esempio, piccoli in soprannumero nelle nidiata rispetto ai 20 prestabiliti).

Esempio 3

10. Si utilizzano 20 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per determinare il peso del cervello e la neuropatologia all'undicesimo giorno (PND 11). Di questi, 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti il PND 11 e i cervelli sono prelevati, pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica. Si ricavano inoltre i dati ponderali dei cervelli non fissati dei restanti 10 maschi e 10 femmine per livello di dose.

11. Si utilizzano altri 20 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove di ontogenesi comportamentale (attività motoria), gli esami post svezzamento (attività motoria e valutazione dell'età della maturazione sessuale), e le prove della funzione cognitiva negli adolescenti.
12. Si utilizzano altri 20 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove sulla funzione motoria e sensoriale (riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro) e per osservazioni cliniche dettagliate. Di questi, 10 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato, pesato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.
13. Si utilizzano ulteriori 20 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove della funzione cognitiva nei giovani adulti. Di questi, 10 animali/sexso/gruppo (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati al termine dello studio per poi prelevare e pesare il cervello.

Tabella 3

N. animale ^(a)		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	10 m + 10 f 10 m + 10 f	Peso cervello/neuropatologia/morfometria al PND 11 Peso cervello al PND 11
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f	Ontogenesi comportamentale (attività motoria) Attività motoria Maturazione sessuale Apprendimento e memoria (PND 27)
3	7	20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro (adolescenti e giovani adulti) Osservazioni cliniche dettagliate Peso cervello/neuropatologia/morfometria nei giovani adulti ~PND 70
4	8	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Apprendimento e memoria (giovani adulti) Peso cervello nei giovani adulti

^(a) In questo esempio le nidiata sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.

*Appendice 2***Definizioni**

Sostanza chimica: sostanza o miscela

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova

B.54. SAGGIO UTEROTROFICO SUI RODITORI: PROVA DI SCREENING A BREVE TERMINE DELLE PROPRIETÀ ESTROGENICHE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 440 (2007). Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario per rivedere le linee guida esistenti ed elaborarne di nuove per lo screening e le prove delle sostanze considerate interferenti endocrini potenziali (1). Tra gli elementi su cui si sono concentrati i lavori figura la messa a punto di una linea guida per il saggio uterotrofico sui roditori. La linea guida è stata poi oggetto di un vasto programma di validazione, che ha incluso la compilazione di un documento di riferimento dettagliato (2)(3) e la realizzazione di intensi studi intra e interlaboratorio, volti a dimostrare la pertinenza e la riproducibilità del saggio eseguito con un potente estrogeno di riferimento, con agonisti deboli dei recettori per gli estrogeni, con un antagonista forte dei recettori per gli estrogeni e con una sostanza chimica di riferimento negativa (4)(5)(6)(7)(8)(9). Il presente metodo di prova B.54 è frutto dell'esperienza acquisita nel corso del programma di validazione e dei risultati ottenuti riguardo agli agonisti degli estrogeni.
2. Il saggio uterotrofico è una prova di screening a breve termine che risale agli anni 30 (27)(28) e che è stata standardizzata per la prima volta nel 1962 a fini di depistaggio da un comitato di esperti (32) (35). Basato sull'aumento del peso uterino, la cosiddetta risposta uterotrofica (cfr. 29), questo metodo valuta la capacità di una sostanza chimica di stimolare un'attività biologica analoga a quella degli agonisti o degli antagonisti degli estrogeni naturali (ad esempio, 17 β -estradiolo), seppure il suo uso per la determinazione degli antagonisti sia molto meno frequente. L'utero risponde agli estrogeni in due modi: inizialmente con un aumento di peso dovuto all'assorbimento di acqua, cui segue un ulteriore aumento causato dalla crescita tissutale (30). La reazione dell'utero nei ratti e nei topi è qualitativamente comparabile.
3. Il presente saggio costituisce una prova di screening in vivo e la sua applicazione deve essere considerata nel contesto del "Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino" (appendice 2). In questo quadro concettuale, il saggio uterotrofico si colloca nel livello 3 come saggio in vivo che fornisce dati riguardo ad un unico meccanismo endocrino, ovvero l'attività estrogenica.
4. Il saggio uterotrofico è destinato a far parte di una batteria di prove in vitro e in vivo volta ad individuare le sostanze chimiche potenzialmente in grado di interagire con il sistema endocrino, e consentire di valutarne i rischi per la salute umana o per l'ambiente. Nel programma di validazione dell'OCSE sono stati utilizzati agonisti degli estrogeni sia forti che deboli per valutare l'efficacia del metodo nell'individuare le sostanze chimiche estrogeniche (4)(5)(6)(7)(8). È stata quindi dimostrata la sensibilità del protocollo sperimentale agli agonisti degli estrogeni, così come la sua buona riproducibilità intra e interlaboratorio.
5. Per quanto riguarda le sostanze chimiche negative, nel programma di validazione è stata inclusa solo una sostanza chimica di riferimento "negativa" già identificata come tale dal saggio uterotrofico e da saggi in vitro dei recettori e del legame con recettori, ma sono stati valutati dati sperimentali supplementari, esterni al programma di validazione OCSE, che hanno confermato la specificità del saggio uterotrofico per lo screening degli agonisti degli estrogeni (16).

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

6. Gli agonisti e gli antagonisti degli estrogeni fungono da ligandi dei recettori estrogenici a e b e possono, rispettivamente, attivare o inibire l'azione trascrizionale dei recettori. Dato che ciò può incidere negativamente sulla salute, in particolare sulla riproduzione e sullo sviluppo, è necessario poter esaminare e valutare rapidamente l'eventuale azione agonista o antagonista degli estrogeni esplicita dalle sostanze chimiche. Sebbene apportino informazioni utili, l'affinità di un ligando per un recettore estrogenico oppure l'attivazione della trascrizione di geni reporter in vitro non sono gli unici fattori che determinano un possibile pericolo. Altri determinanti possono essere l'attivazione e la disattivazione metabolica dopo l'ingresso della sostanza chimica nell'organismo, la sua distribuzione nei tessuti bersaglio e l'eliminazione dall'organismo, che dipendono, almeno in parte, dalla via di somministrazione e dalla sostanza stessa. Occorre pertanto indagare l'eventuale attività di una sostanza chimica in vivo, in condizioni idonee, a meno che le sue caratteristiche relative all'assorbimento, alla distribuzione, al metabolismo e all'eliminazione (ADME) non forniscano già le informazioni necessarie. I tessuti dell'utero rispondono con una crescita rapida e vigorosa alla stimolazione con estrogeni, in particolare nei roditori da laboratorio, il cui ciclo estrale ha una durata di circa 4 giorni. I roditori, in particolare il ratto, sono ampiamente utilizzati anche negli studi di tossicità per la caratterizzazione dei pericoli. L'utero dei roditori è pertanto un organo bersaglio adatto per lo screening in vivo degli agonisti e degli antagonisti degli estrogeni.
7. Il presente metodo di prova si basa sui protocolli impiegati nello studio di validazione dell'OCSE che si sono dimostrati affidabili e ripetibili negli studi intra e interlaboratorio (5)(7). Attualmente sono praticabili due metodi: l'uno che utilizza femmine adulte ovariectomizzate e l'altro che utilizza femmine immature non ovariectomizzate. Nel programma di validazione delle prove dell'OCSE si è visto che entrambi i metodi possiedono sensibilità e

riproducibilità analoghe. Tuttavia, il metodo con femmine immature, il cui asse ipotalamo-ipofisario-ovarico (HPG) è intatto, è forse meno specifico ma copre un campo di investigazione più vasto rispetto al metodo che utilizza animali ovariectomizzati, perché è sensibile alle sostanze chimiche che interagiscono con l'asse HPG e non soltanto a quelle che interagiscono con i recettori degli estrogeni. Nel ratto l'asse HPG è funzionale a partire circa dal 15° giorno successivo alla nascita. Prima di questa fase, la pubertà non può essere accelerata, somministrando, ad esempio, GnRH. Con l'approssimarsi della pubertà, prima dell'apertura vaginale, la femmina avrà diversi cicli silenti, senza apertura vaginale o ovulazione ma con alcune fluttuazioni ormonali. Se una sostanza chimica stimola direttamente o indirettamente l'asse HPG, si avrà pubertà precoce, ovulazione precoce e apertura vaginale accelerata. L'accelerazione della crescita e dell'apertura vaginale è stimolata non solo dalle sostanze chimiche che agiscono sull'asse HPG, ma anche da alcuni regimi alimentari con livelli di energia metabolizzabile più alti della norma senza essere estrogenici. Queste sostanze non inducono una risposta uterotrofica nelle femmine adulte ovariectomizzate perché il loro asse HPG non funziona.

8. In un'ottica di attenzione al benessere degli animali, il metodo da preferirsi è quello che utilizza ratti immaturi, evitando in tal modo il pretrattamento chirurgico e il rischio di non poter utilizzare gli animali che manifestano segni di pre-estro (cfr. paragrafo 30).
9. La risposta uterotrofica non è esclusivamente di origine estrogenica, ma può essere stimolata anche da sostanze chimiche diverse dagli agonisti o dagli antagonisti degli estrogeni. Ad esempio, dosi relativamente elevate di progesterone e testosterone o di varie progestine sintetiche possono anch'esse indurre una stimolazione (30). Qualsiasi risposta può essere oggetto di un esame istologico volto a rilevare tessuti vaginali cheratinizzati e corneificati (30). A prescindere dalla possibile origine della risposta, l'esito positivo di un saggio uterotrofico deve di norma essere seguito da ricerche più approfondite. L'attività estrogenica può essere confermata da prove in vitro, come i saggi di legame ai recettori estrogenici e i saggi di attivazione della trascrizione, o da altri saggi in vivo come quello della pubertà nelle femmine.
10. Fermo restando che il saggio uterotrofico costituisce una prova di screening in vivo, il metodo adottato per la sua convalida ha tenuto conto del benessere degli animali e si configura come una strategia di prove in sequenza. A tal fine, i lavori sono stati diretti principalmente a convalidare con rigore la riproducibilità e la sensibilità del depistaggio dell'attività estrogenica (il problema maggiore posto da molte sostanze chimiche), mentre solo alcuni sono stati dedicati alla componente antiestrogenica della prova. È stato testato un solo potente antiestrogeno, poiché il numero di sostanze chimiche dotate di un chiaro profilo antiestrogenico (non confuso da una qualche attività estrogenica) è molto limitato. Il presente metodo di prova è quindi destinato al protocollo estrogenico, mentre il protocollo che descrive il modo antagonista della prova è illustrato in un documento di orientamento (37). Per quanto riguarda le sostanze chimiche che esplicano un'attività esclusivamente antiestrogenica, la riproducibilità e la sensibilità del saggio saranno definite più chiaramente in un secondo tempo, quando il protocollo sperimentale sarà ormai divenuto di routine e dopo che sarà stato identificato un maggior numero di sostanze chimiche aventi tale modo di azione.
11. Tutti i protocolli che prevedono l'uso di animali rispetteranno le norme locali in materia di benessere animale; la descrizione delle cure e del trattamento che figurano in appresso costituiscono norme minime alle quali si sostituiranno le regolamentazioni locali, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (38). Per ulteriori orientamenti relativi al trattamento degli animali nel rispetto delle norme etiche si veda la pubblicazione dell'OCSE di cui al riferimento bibliografico 25.
12. Come per tutte le prove che utilizzano animali vivi, prima di iniziare il saggio è fondamentale assicurarsi che i dati ricercati siano realmente necessari, come possono esserlo nei due casi seguenti:
 - potenziale di esposizione elevato (livello 1 del quadro concettuale, di cui all'appendice 2) oppure elementi indicanti attività estrogenica (livello 2) tali da giustificare la necessità di investigare se tali effetti si possono produrre in vivo;
 - effetti indicanti attività estrogenica nei livelli 4 o 5 delle prove in vivo, tali da giustificare la necessità di dimostrare il loro legame con un meccanismo estrogenico non evidenziabile con prove in vitro.
13. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

14. La sensibilità del saggio uterotrofico richiede un sistema sperimentale nel quale l'asse ipotalamo-ipofisario-ovarico dell'animale non sia funzionale, con conseguenti livelli minimi di estrogeni endogeni in circolazione; in tal modo si garantisce un peso uterino di partenza basso e un range massimo di risposta agli estrogeni somministrati. I roditori femmina soddisfano queste condizioni nei seguenti stati di sensibilità agli estrogeni:
- i) femmine immature, dopo lo svezzamento e prima della pubertà, e
 - ii) giovani adulte ovariectomizzate, trascorso il periodo necessario alla regressione dei tessuti uterini.
15. La sostanza chimica è somministrata ogni giorno tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Si somministrano dosi scalari ad almeno due gruppi di animali (precisazioni al paragrafo 33), esponendo ogni gruppo a un livello di dose. Il periodo di somministrazione è di tre giorni consecutivi nel metodo che utilizza le femmine immature e di almeno tre giorni consecutivi nel metodo con le femmine adulte ovariectomizzate. Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Per lo studio degli agonisti degli estrogeni, si confronta il peso uterino medio degli animali trattati con quello del gruppo di controllo che ha ricevuto solo il mezzo disperdente, per determinare se esiste un aumento statisticamente significativo. Nel presente saggio, un aumento statisticamente significativo del peso uterino medio di un gruppo sperimentale indica una risposta positiva.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

16. Si possono utilizzare i ceppi di roditori di uso comune nei laboratori, ad esempio, i ceppi di ratti Sprague-Dawley e Wistar impiegati nella validazione. Non si dovranno utilizzare ceppi dei quali si sa o si sospetta che l'utero è meno reattivo. Il laboratorio deve dimostrare la sensibilità del ceppo utilizzato come descritto nei paragrafi 26 e 27.
17. L'uso del ratto e del topo come specie di routine per il saggio uterotrofico risale agli anni 30. Gli studi di validazione dell'OCSE sono stati effettuati unicamente sui ratti, partendo dal presupposto che le due specie siano equivalenti e che, per risparmiare risorse e animali, una sola specie sia sufficiente per la validazione a livello internazionale. Il ratto è la specie scelta nella maggior parte degli studi di tossicità per la riproduzione e nella fase dello sviluppo. Dato che esiste una ricca base di dati storici sul topo, per ampliare il campo di applicazione del saggio uterotrofico sui roditori e includere questa specie, è stato condotto un studio complementare di validazione, più circoscritto, sul topo (16). Si è scelto di adottare un approccio comparativo, con un numero limitato di sostanze chimiche esaminate, un numero minore di laboratori coinvolti e senza campioni codificati, in modo da rispettare l'intenzione iniziale di risparmiare risorse e animali. Questo studio comparativo di validazione ha mostrato che esiste una buona corrispondenza qualitativa e quantitativa tra i dati ottenuti nei saggi uterotrofici realizzati con femmine di topo giovani adulte ovariectomizzate e i dati ottenuti nei saggi analoghi con femmine di ratto. Quando i risultati del saggio uterotrofico si inseriscono in una fase preliminare di uno studio a lungo termine, è possibile utilizzare in entrambi gli studi animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza. L'approccio comparativo è stato applicato solo per le prove con la femmina di topo ovariectomizzata e la relativa relazione non contiene un insieme di dati abbastanza solido da convalidare il modello che utilizza femmine immature, ragion per cui tale modello non rientra nel campo di applicazione del presente metodo di prova.
18. È quindi comprovato che, in alcuni casi, è possibile utilizzare il topo invece del ratto. Questa scelta dovrà essere giustificata da dati tossicologici, farmacocinetici e/o di altra natura e potrà comportare la necessità di modificare il protocollo. Ad esempio, il consumo alimentare del topo rispetto al suo peso corporeo è più elevato di quello del ratto, per cui la quantità di fitoestrogeni contenuta negli alimenti dovrà essere inferiore (9)(20)(22).

Condizioni di stabulazione e alimentazione

19. Tutte le procedure devono essere conformi agli standard locali in materia di cura degli animali sperimentali. Le cure e il trattamento qui descritti costituiscono norme minime alle quali si sostituiranno le regolamentazioni locali, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (38). La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve mantenersi intorno al 50-60 %; in ogni caso non deve essere inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12:12 (luce/buio).
20. Gli animali ricevono alimentazione da laboratorio e acqua da bere a volontà. I giovani adulti possono essere alloggiati individualmente o in gruppi fino a tre animali. Data la giovane età, gli animali immaturi sono di preferenza alloggiati in gabbie collettive.

21. È noto che le diete da laboratorio contenenti livelli elevati di fitoestrogeni fanno aumentare il peso uterino nei roditori in misura sufficiente ad interferire con il saggio uterotrofico (13)(14)(15). Livelli elevati di fitoestrogeni e di energia metabolizzabile nelle diete da laboratorio possono anche indurre una pubertà precoce, se sono utilizzati animali immaturi. La presenza di fitoestrogeni dipende innanzitutto dall'inclusione di prodotti a base di soia e erba medica nelle diete da laboratorio e si è constatato che le concentrazioni di fitoestrogeni variano da un lotto di alimenti all'altro (23). Il peso corporeo è una variabile importante, dato che è in stretta relazione con la quantità di alimenti assunti. Pertanto, la dose di fitoestrogeni effettivamente assunta con la stessa dieta può variare secondo la specie e l'età (9). Nei ratti, il consumo alimentare rispetto al peso corporeo della femmina immatura può essere circa doppio di quello della giovane adulta ovariectomizzata, mentre nei topi questo rapporto arriva ad essere quadruplo.
22. I risultati del saggio uterotrofico (9)(17)(18)(19), tuttavia, indicano che, se presenti nella dieta in deboli quantità, i fitoestrogeni non riducono la sensibilità della prova e sono quindi ammessi. A titolo indicativo, le quantità di fitoestrogeni negli alimenti non devono superare 350 µg di equivalente genisteina/grammo di miscela per laboratorio per le femmine immature di ratto Sprague Dawley e Wistar (6)(9). Questa dieta dovrebbe essere adatta anche per le prove sulle giovani adulte ovariectomizzate, le quali, in proporzione al peso corporeo, consumano meno cibo rispetto agli animali immaturi. Se si devono utilizzare femmine di topo adulte ovariectomizzate oppure femmine di ratto più sensibili ai fitoestrogeni, occorrerà ridurre proporzionalmente i livelli di fitoestrogeni nella dieta (20). Un altro fattore da considerare è che l'energia metabolizzabile disponibile varia da una dieta all'altra, e tale differenza può tradursi in uno sfasamento dell'inizio della pubertà (21)(22).
23. Prima di cominciare lo studio occorre scegliere attentamente una dieta povera in fitoestrogeni [per maggiori indicazioni, cfr. (6)(9)] o in energia metabolizzabile, per evitare di falsare i risultati (15)(17)(19)(22)(36). Per tenere sotto controllo questi due fattori è importante garantire il buon funzionamento del sistema sperimentale utilizzato dal laboratorio seguendo quanto indicato ai paragrafi 26 e 27. Come misura di precauzione, in conformità alle buone prassi di laboratorio (BPL), si preleva un campione rappresentativo di ciascun lotto di alimenti somministrati durante lo studio per ricercarvi eventualmente la presenza di fitoestrogeni (ad esempio, in caso di peso uterino elevato negli animali di controllo rispetto ai dati storici, oppure in caso di risposta inadeguata all'estrogeno di riferimento, 17- α -etinilestradiolo). Le aliquote sono analizzate nell'ambito dello studio, congelate a - 20 °C, oppure conservate in modo da evitare che il campione si decomponga prima dell'analisi.
24. Alcuni tipi di lettiera possono contenere sostanze estrogeniche o antiestrogeniche naturali (ad esempio, si sa che il tutolo influisce sulla ciclicità nelle femmine di ratto e potrebbe avere effetti antiestrogenici). Il tipo di lettiera scelto dovrà contenere un livello minimo di fitoestrogeni.

Preparazione degli animali

25. Gli animali sperimentali, scelti dopo aver verificato che non presentino segni di malattie né di anomalie fisiche, sono assegnati a caso ai gruppi di trattamento e di controllo. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali vanno identificati in modo univoco. Di preferenza, durante l'acclimatazione, gli animali immaturi sono messi in gabbia con le loro madri o con altre femmine che allattano fino allo svezzamento. Il periodo di acclimatazione prima dell'inizio dello studio è di circa 5 giorni per le giovani femmine adulte e per gli animali immaturi accompagnati dalle loro madri o da altre femmine. Se gli animali immaturi non sono accompagnati dalla madre e sono già svezzati, il periodo di acclimatazione dovrà essere necessariamente più corto, perché la somministrazione deve iniziare immediatamente dopo lo svezzamento (cfr. paragrafo 29).

PROTOCOLLO

Verifica della competenza del laboratorio

26. La competenza del laboratorio può essere verificata in due modi:
- mediante una verifica periodica, con riferimento a uno studio iniziale di controllo positivo (cfr. paragrafo 27). Almeno ogni 6 mesi e ogni volta che si verifica un cambiamento che può influire sull'esito della prova (ad esempio, una nuova formulazione della dieta, personale diverso che esegue le dissezioni, cambio di ceppo o di fornitore ecc.), occorre verificare la sensibilità del sistema sperimentale (modello animale) a una dose congrua (stabilita in base allo studio iniziale di controllo positivo di cui al paragrafo 27) dell'estrogeno di riferimento, ossia il 17- α -etinilestradiolo (n. CAS 57-63-6) (EE);
 - mediante il concomitante allestimento di gruppi di controllo, includendo in ciascuna prova un gruppo che riceve una dose congrua dell'estrogeno di riferimento.

Se il sistema non risponde come previsto, occorre rivedere le condizioni sperimentali e modificarle di conseguenza. In entrambi i casi la dose raccomandata dell'estrogeno di riferimento corrisponde circa a DE 70-80 (DE: dose efficace).

27. **Studio iniziale di controllo positivo** — Prima di eseguire uno studio applicando per la prima volta il presente metodo di prova, il laboratorio deve dimostrare la propria competenza determinando la risposta del modello animale ad almeno quattro dosi dell'estrogeno di riferimento, il 17 α -etinilestradiolo (n. CAS 57-63-6). L'effetto sul peso uterino sarà confrontato con i dati storici consolidati [cfr. riferimento (5)]. Se questo studio iniziale non dà l'esito previsto, le condizioni sperimentali devono essere esaminate e modificate.

Numero e condizione degli animali

28. Ciascun gruppo trattato e di controllo è composto di almeno 6 animali, sia nel protocollo con femmine immature sia in quello con adulte ovariectomizzate.

Età degli animali immaturi

29. Per il saggio uterotrofico con animali immaturi è necessario indicare il giorno di nascita. La somministrazione deve iniziare con sufficiente anticipo per far sì che, alla fine del periodo di somministrazione, non si sia ancora verificato l'aumento fisiologico degli estrogeni endogeni connesso con la pubertà. D'altro canto, è stato constatato che gli animali molto giovani possono essere meno reattivi. Per definire l'età ottimale, ogni laboratorio deve basarsi sui propri dati di riferimento sulla maturazione sessuale.

In linea di massima, la somministrazione delle dosi nei ratti può iniziare subito dopo uno svezzamento precoce, il 18° giorno dopo la nascita (PND 18, tenuto conto che il giorno della nascita corrisponde al giorno 0), e terminare, di preferenza, il PND 21, e comunque prima del PND 25: a partire da questa età l'asse ipotalamo-ipofisario-ovarico dell'animale diviene funzionale e il livello di estrogeni può cominciare ad innalzarsi, con il concomitante aumento sia del peso uterino medio di riferimento sia della deviazione standard dei gruppi (2)(3)(10)(11)(12).

Ovariectomia

30. L'ovariectomia delle femmine di ratto e topo dei gruppi di trattamento e di controllo è praticata tra la sesta e l'ottava settimana di età. Il tempo che deve trascorrere tra l'operazione e la prima somministrazione affinché l'utero ritorni a un peso minimo di riferimento e si stabilizzi è di almeno 14 giorni nel ratto e almeno 7 giorni nel topo. Poiché basta una piccola quantità di tessuto ovarico per produrre livelli significativi di estrogeni circolanti (3), gli animali devono essere controllati prima della prova, osservando le cellule epiteliali prelevate mediante striscio vaginale per almeno cinque giorni consecutivi (ad esempio, dal 10° al 14° giorno dopo l'ovariectomia nel ratto). Gli animali che presentano segni di pre-estro non devono essere utilizzati. Inoltre, al momento dell'autopsia, occorre esaminare i peduncoli ovarici per determinare se resta del tessuto ovarico, nel qual caso, i dati relativi all'animale non devono essere presi in considerazione nei calcoli (3).
31. L'ovariectomia è praticata sull'animale disteso sul ventre, opportunamente anestetizzato. Si incide la zona dorso-laterale della parete addominale con un taglio di circa 1 cm nel punto intermedio tra il bordo costale inferiore e la cresta iliaca, a qualche millimetro dal margine laterale del muscolo lombare. Si asportano le ovaie dalla cavità addominale, le si deposita su campo sterile e si recidono a livello della giunzione dell'ovidotto e del corpo dell'utero. Dopo aver escluso la presenza di emorragia importante, si sutura la parete addominale e si richiude la pelle con clip o sutura idonea. I punti di legatura sono indicati schematicamente nella figura 1. Sarà poi praticata un'analgesia postoperatoria adeguata, raccomandata da un veterinario specializzato in roditori.

Peso corporeo

32. Nel metodo che utilizza femmine adulte ovariectomizzate, il peso corporeo e il peso dell'utero non sono correlati, perché quest'ultimo è influenzato da ormoni come gli estrogeni, ma non dai fattori di crescita che regolano la corporatura. Il peso corporeo è invece connesso al peso uterino negli animali immaturi, durante il periodo di maturazione (34). Pertanto, all'inizio dello studio con animali immaturi, la variazione di peso tra gli animali deve

essere minima e non superare $\pm 20\%$ del peso medio. Ciò significa che le dimensioni della nidiata devono essere standardizzate dall'allevatore, per garantire che la progenie di madri diverse sia nutrita più o meno allo stesso modo. Gli animali sono assegnati ai gruppi (di controllo e di trattamento) in maniera aleatoria, in modo che non vi sia alcuna differenza statistica tra il peso corporeo medio dei vari gruppi. Conviene evitare nella misura del possibile di destinare animali della stessa nidiata allo stesso gruppo di trattamento, senza però che ciò comporti un aumento del numero di nidiata necessarie allo studio.

Dosaggio

33. Per stabilire se una sostanza chimica può avere un'azione estrogenica in vivo, in genere è sufficiente allestire due gruppi-dose e un gruppo di controllo: è questo il disegno sperimentale da preferirsi per motivi dettati dal benessere degli animali. Se lo scopo è ottenere una curva della relazione dose-risposta o estrapolare i risultati per applicarli a dosi più basse, sono necessari almeno 3 gruppi-dose. Se si desidera ottenere informazioni più particolareggiate sull'attività estrogenica (ad esempio, una stima dell'efficacia) occorre prevedere un altro schema di dosaggio. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico a quelli dei gruppi che ricevono il trattamento. Se per somministrare la sostanza in esame si utilizza un mezzo disperdente, il gruppo di controllo riceverà la stessa quantità di mezzo disperdente usato per i gruppi trattati (o la quantità massima utilizzata se questa varia da gruppo a gruppo).
34. L'obiettivo, nel caso del saggio uterotrofico, è di scegliere delle dosi che garantiscano la sopravvivenza degli animali e non inducano tossicità né distress significativi dopo tre giorni consecutivi di somministrazione della sostanza chimica, fino a una dose massima quotidiana di 1 000 mg/kg. Tutti i livelli di dose devono essere proposti e scelti tenendo conto degli eventuali dati esistenti sulla tossicità e sulla (tossico)cinetica della sostanza in esame o di sostanze affini. Il livello di dose più elevato deve essere stabilito innanzitutto in base alla DL50 e/o alle informazioni sulla tossicità acuta, onde evitare il decesso, sofferenze gravi o distress degli animali (24)(25)(26). La dose più elevata deve costituire la dose massima tollerata (MTD); è anche possibile basarsi su uno studio effettuato utilizzando un livello di dose che abbia indotto una risposta uterotrofica positiva. Per uno screening, è possibile in genere distanziare di molto i livelli di dose (ad esempio, a intervalli di mezza unità logaritmica, ossia a un fattore di progressione di 3,2 o persino 1 unità logaritmica). In mancanza di dati al riguardo, si può svolgere uno studio volto ad identificare il range di dosi utilizzabili.
35. In alternativa, se l'efficacia estrogenica di un agonista può essere stimata mediante dati in vitro (o in silico), questi possono essere presi in considerazione per la scelta delle dosi. Ad esempio, la quantità di sostanza chimica in esame che produrrà risposte uterotrofiche equivalenti a quelle dell'agonista di riferimento (etinilestradiolo) è stimata tramite la corrispettiva efficacia in vitro rispetto a quella dell'etinilestradiolo. La dose sperimentale massima si ottiene moltiplicando questa dose equivalente per un fattore adeguato, ad esempio 10 o 100.

Determinazione del range di dosi

36. Se necessario, è possibile effettuare uno studio preliminare con pochi animali per individuare il range di dosi. A tale riguardo, può essere utile consultare il documento di orientamento dell'OCSE n. 19 (25), che definisce i segni clinici di tossicità o distress negli animali. Se tale studio preliminare lo consente, dopo tre giorni di trattamento gli uteri possono essere escissi e pesati a circa 24 ore dall'ultima dose. I dati ricavati possono poi essere utilizzati per mettere a punto lo studio principale (individuare la dose massima e minima accettabili e raccomandare il numero di gruppi-dose).

Somministrazione delle dosi

37. La sostanza chimica è somministrata tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Quando si sceglie la via di somministrazione occorre tener conto sia del benessere degli animali sia di vari aspetti tossicologici, quali l'attinenza con la via di esposizione umana alla sostanza chimica (sonda orogastrica per un'esposizione tramite ingestione, iniezione sottocutanea per un'esposizione mediante inalazione o assorbimento cutaneo), le caratteristiche fisico-chimiche della sostanza in esame e soprattutto le informazioni tossicologiche e i dati metabolici e cinetici (ad esempio, la necessità di evitare il metabolismo di primo passaggio, una migliore efficacia di una determinata via di somministrazione).
38. Si raccomanda di considerare in primo luogo, ogniqualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa. Dato però che i ligandi degli estrogeni o i loro precursori metabolici tendono ad essere idrofobi, è più comune utilizzare una soluzione/sospensione oleosa (ad esempio, olio di mais, di arachidi, di sesamo o d'oliva). Tuttavia, poiché questi oli non hanno lo stesso valore calorico, né lo stesso tenore in grassi, il mezzo disperdente può influire sull'apporto complessivo di energia metabolizzabile, alterando di conseguenza gli endpoint misurati, quali il peso uterino, soprattutto nel metodo che impiega gli animali immaturi (33). Pertanto, prima di iniziare lo studio, il mezzo disperdente prescelto deve essere testato con riferimento ai controlli senza mezzo disperdente. Le

sostanze in esame possono essere disciolte in una quantità minima di etanolo 95 % o di altri solventi idonei, poi diluite nel mezzo disperdente prescelto alle concentrazioni finali desiderate. Le caratteristiche tossiche del solvente devono essere note e testate su un gruppo di controllo a parte trattato unicamente con il solvente. Se la sostanza in esame è considerata stabile, se ne può favorire la solubilizzazione riscaldandola leggermente e sottoponendola ad una azione meccanica vigorosa. È necessario determinare la stabilità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente. Se la sostanza in esame rimane stabile per tutta la durata dello studio, se ne prepara inizialmente un'aliquota, dopodiché giorno per giorno si preparano le diluizioni necessarie.

39. Il calendario per la somministrazione dipende dal modello animale utilizzato (cfr. paragrafo 29 per le femmine immature e il paragrafo 30 per le femmine ovariectomizzate). Nel caso delle femmine di ratto immature, la sostanza in esame è somministrata quotidianamente per tre giorni consecutivi. Un trattamento della durata di tre giorni è raccomandato anche per le femmine di ratto ovariectomizzate, le quali possono però essere esposte anche per periodi più lunghi, favorendo in tal modo la ricerca di sostanze ad azione più debole. Per le femmine di topo ovariectomizzate, tre giorni di trattamento sono di norma sufficienti per individuare gli agonisti estrogenici potenti, senza che vi siano vantaggi significativi a prolungare questo periodo fino a sette giorni, mentre per gli estrogeni deboli lo studio di validazione non ha comprovato tale relazione (16), pertanto la durata della somministrazione deve essere protratta fino a sette giorni consecutivi. La dose va somministrata ogni giorno all'incirca alla stessa ora e regolata in modo da mantenere un livello costante rispetto al peso corporeo degli animali (ad esempio, mg di sostanza in esame per kg di peso corporeo al giorno). Si deve ridurre al minimo la variabilità del volume in esame rispetto al peso corporeo, adeguando le concentrazioni in modo che, in proporzione al peso corporeo, il volume somministrato sia lo stesso per tutti i livelli di dose e per tutte le vie di somministrazione.
40. La somministrazione forzata deve effettuarsi in dose unica giornaliera, mediante sonda gastrica o cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale e dalle linee guida locali sulla cura degli animali, ma in ogni caso non deve essere superiore a 5 ml/kg di peso corporeo, salvo nel caso di soluzioni acquose, delle quali se ne possono somministrare 10 ml/kg di peso corporeo.
41. Se la sostanza in esame è iniettata per via sottocutanea, la somministrazione si effettua in dose unica giornaliera. Le iniezioni sono effettuate nella regione dorsoscapolare o lombare con ago sterile (di calibro 23 o 25) e una siringa da insulina. La rasatura del sito di iniezione è facoltativa. Le eventuali perdite e fuoriuscite di liquido al momento dell'iniezione o una somministrazione incompleta devono essere indicate nella relazione. Il volume complessivo per ratto per giorno non supera 5 ml/kg di peso corporeo, suddiviso in due siti di iniezione, tranne nel caso delle soluzioni acquose, delle quali si possono utilizzare 10 ml/kg di peso corporeo.

Osservazioni

Osservazioni generali e cliniche

42. Almeno una volta al giorno si esegue un'osservazione clinica generale, con più frequenza se si constatano segni di tossicità. Le osservazioni sono effettuate di preferenza ogni giorno alla stessa ora e tenendo conto del momento in cui si prevede che gli effetti siano più accentuati dopo la somministrazione delle dosi. Tutti gli animali sono osservati per controllare la mortalità, la morbidità e i segni clinici generali quali alterazioni del comportamento, della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, comparsa di secrezioni ed escrezioni e l'attività autonoma (ad esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, alterazioni della respirazione).

Peso corporeo e consumo alimentare

43. Tutti gli animali sono pesati quotidianamente (peso espresso in grammi, arrotondato al primo decimale), a partire da appena prima di avviare il trattamento, ossia al momento dell'assegnazione degli animali ai gruppi. Si può scegliere di misurare anche la quantità di cibo consumata durante il periodo del trattamento in ogni gabbia, pesando i contenitori di cibo. I dati sul consumo alimentare sono espressi in grammi per ratto al giorno.

Dissezione e pesatura dell'utero

44. Ventiquattro ore dopo l'ultimo trattamento, i ratti sono soppressi con metodi non cruenti. Idealmente, l'ordine nel quale i gruppi di animali sono sottoposti ad autopsia è aleatorio e non segue l'ordine crescente o decrescente delle dosi, perché ciò potrebbe influire leggermente sui dati. L'obiettivo del saggio è di misurare il peso umido e il peso secco degli uteri. Il peso umido è quello dell'utero e del fluido del lume. Il peso secco è quello misurato dopo la spremitura dell'utero e l'eliminazione del fluido.

45. Prima della dissezione si esamina la vagina delle femmine immature per osservarne lo stato di apertura. La dissezione inizia con l'apertura della parete addominale a livello della sinfisi pubica. Le corna uterine e le ovaie, se presenti, sono staccate dalla parete addominale dorsale. La vescica e gli ureteri sono separati dal lato ventrale e laterale dell'utero e della vagina. Il tessuto fibroso del setto retto-vaginale è scollato fino a individuare la giunzione dell'orificio vaginale e della cute perineale. L'utero e la vagina sono staccati dal corpo incidendo la parete vaginale appena sopra la giunzione della cute perineale, come illustrato nella figura 2. L'utero è staccato dal corpo recidendo delicatamente il mesentero nel punto di attacco lungo tutta la componente dorso-laterale di ciascun corno uterino. Una volta estratto, l'utero deve essere manipolato con rapidità tale da evitare la disidratazione dei tessuti. La perdita di peso dovuta a disidratazione è più importante con tessuti di piccole dimensioni, come l'utero (23). Se presenti, le ovaie sono staccate a livello dell'ovidutto, procedendo in modo da evitare la perdita di fluido del lume dal corno uterino. Se l'animale è stato ovariectomizzato, i peduncoli sono esaminati per rilevare l'eventuale presenza di tessuto ovarico. Si eliminano il grasso in eccesso e il tessuto connettivo. La vagina è staccata dall'utero appena sotto la cervice, in modo che quest'ultima resti insieme al corpo dell'utero, come illustrato nella figura 2.
46. Ogni utero è trasferito in un recipiente tarato e recante un contrassegno univoco (ad esempio, una capsula Petri o una navicella per pesata in plastica), continuando a fare attenzione a che non si disidrati prima della pesata (si può collocare nel recipiente un pezzo di carta da filtro leggermente inumidito con soluzione salina). Si pesa l'utero e il fluido del lume (peso uterino umido, espresso in mg e arrotondato al primo decimale).
47. Ogni utero è poi trattato singolarmente per eliminare il fluido del lume. Si perforano le due corna uterine oppure le si taglia lungo l'asse longitudinale. Si deposita l'utero su un pezzo di carta da filtro leggermente inumidita (ad esempio, Whatman n. 3) e lo si comprime delicatamente con un secondo pezzo di carta da filtro, anch'esso leggermente inumidito, fino ad eliminare completamente il fluido del lume. Si pesa l'utero svuotato del suo contenuto del lume (peso uterino secco, espresso in mg arrotondato al primo decimale).
48. Il peso uterino a fine prova può servire per verificare che le femmine di ratto immature intatte non abbiano superato l'età appropriata, sebbene i dati storici del ceppo utilizzato dal laboratorio siano determinanti a questo riguardo (per l'interpretazione dei risultati, cfr. paragrafo 56).

Studi facoltativi

49. L'utero, dopo essere stato pesato, può essere messo in formalina tamponata al 10 % a pH neutro per essere sottoposto a esame istopatologico, previa colorazione con ematossilina ed eosina. Anche la vagina può essere esaminata (cfr. paragrafo 9). Si possono inoltre eseguire misurazioni morfometriche dell'epitelio endometriale a fini di raffronti quantitativi.

DATI E RELAZIONE

Dati

50. I dati devono comprendere:
- numero degli animali all'inizio della prova,
 - numero e identità degli animali trovati morti durante la prova o soppressi a fini etici, nonché data e ora di ogni decesso naturale o indotto,
 - numero e identità degli animali che presentano segni di tossicità e descrizione dei segni di tossicità osservati, con indicazione di data e ora della loro comparsa, durata e gravità degli effetti tossici, e
 - numero e identità degli animali che presentano lesioni e descrizione del tipo di lesione.
51. Il peso corporeo, il peso uterino umido e il peso uterino secco sono informazioni da indicare nella relazione per ciascun animale. Per determinare se la somministrazione della sostanza in esame provoca un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) del peso uterino si ricorre ad analisi statistiche unilaterali per gli agonisti. Occorre effettuare analisi statistiche atte a determinare se il peso uterino secco e umido ha subito alterazioni dovute alla sostanza somministrata. Ad esempio, i dati possono essere valutati mediante un'analisi di covarianza (ANCOVA) in cui la covariabile è il peso corporeo al momento dell'autopsia. L'analisi dei dati uterini può essere preceduta da una trasformazione logaritmica che stabilizza la varianza. I test di Dunnett e Hsu si prestano per confrontare in parallelo ogni gruppo-dose e i controlli con mezzo disperdente e calcolare gli intervalli di confidenza. Per

individuare eventuali valori anomali (*outlier*) e verificare l'omogeneità delle varianze si può applicare un'analisi del residuo studentizzato. Queste procedure sono state applicate nel programma di validazione dell'OCSE con l'ausilio della PROC GLM del sistema di analisi statistica (SAS Institute, Cary, NC), versione 8 (6)(7).

52. La relazione finale deve contenere le seguenti informazioni.

Centro di saggio:

- personale responsabile dello studio e rispettive responsabilità,
- dati dello studio iniziale di controllo positivo e dati periodici di controllo positivo (cfr. paragrafi 26 e 27).

Sostanza chimica in esame:

- caratterizzazione della sostanza chimica in esame,
- natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche,
- metodo e frequenza della preparazione delle diluizioni,
- qualsiasi dato ottenuto sulla stabilità,
- qualsiasi analisi delle soluzioni somministrate.

Mezzo disperdente:

- caratterizzazione del mezzo disperdente utilizzato nella prova (natura, fornitore e lotto),
- giustificazione della scelta del mezzo disperdente (se diverso dall'acqua).

Animali sperimentali:

- specie e ceppo utilizzati e giustificazione della scelta,
- fornitore e stabilimento specifico del fornitore,
- età all'epoca della consegna e data di nascita,
- per gli animali immaturi, indicare se forniti con la madre o altra femmina che allatta e data dello svezzamento,
- dettagli della procedura di acclimatazione degli animali,
- numero di animali per gabbia,
- dettagli e metodo di identificazione dei singoli esemplari e dei gruppi.

Condizioni sperimentali:

- dettagli del processo di randomizzazione (ad esempio, metodo utilizzato),
- motivazione della scelta delle dosi,
- dettagli della formulazione della sostanza chimica in esame, delle concentrazioni ottenute, della stabilità e dell'omogeneità,
- dettagli della somministrazione della sostanza chimica in esame e motivazione della scelta della via di esposizione,
- dieta (nome, tipo, fornitore, composizione e, se noti, livelli di fitoestrogeni),
- tipo di acqua (ad esempio, di rubinetto o filtrata) e modo di somministrazione (abbeveratoi alimentati da un grande recipiente, biberon ecc.),
- lettiera (nome, tipo, fornitore, composizione),
- dati sulle condizioni di stabulazione, fotoperiodo, temperatura, umidità e pulizia del locale,
- descrizione dettagliata dell'autopsia e della pesatura degli uteri,
- descrizione dei metodi statistici.

*Risultati**Per ciascun animale:*

- registrazione giornaliera del peso corporeo (in grammi, arrotondato al primo decimale), a partire dal momento dell'assegnazione al gruppo fino all'autopsia,
- età dell'animale (espressa in giorni, tenuto conto che il giorno 0 è quello della nascita) all'inizio della somministrazione della sostanza in esame,
- data e ora di ciascuna somministrazione,
- volume calcolato e dosaggio somministrato e osservazioni sulle eventuali perdite di prodotto durante o dopo la somministrazione,
- registrazione giornaliera dello stato dell'animale, con particolare indicazione dei sintomi e delle osservazioni,
- causa sospetta del decesso (se l'animale è trovato morto o moribondo durante lo studio),
- data e ora dell'eutanasia e tempo trascorso dalla somministrazione dell'ultima dose,
- peso uterino umido (in mg, arrotondato al primo decimale) e eventuali osservazioni sulle perdite di fluido del lume durante la dissezione e la preparazione per la pesata,
- peso uterino secco (in mg, arrotondato al primo decimale).

Per ciascun gruppo di animali:

- registrazione giornaliera del peso corporeo medio (in grammi, arrotondato al primo decimale) e deviazioni standard (a partire dal momento dell'assegnazione al gruppo fino all'autopsia),
- peso uterino medio fresco e secco (in mg, arrotondato al primo decimale) e deviazioni standard,
- se misurato, consumo alimentare giornaliero (calcolato in grammi di cibo consumato per animale),
- risultati delle analisi statistiche comparative del peso uterino fresco e secco dei gruppi trattati e di quello dei gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente,
- risultati delle analisi statistiche comparative del peso corporeo complessivo e dell'aumento di peso corporeo dei gruppi trattati con quello dei gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente.

53. Tabella riassuntiva degli elementi salienti del metodo di prova

	Ratto	Topo
Animali		
Ceppo	Ceppo di roditori comunemente usato in laboratorio	
Numero di animali	Un minimo di 6 animali per gruppo	
Numero di gruppi	Un minimo di 2 gruppi sperimentali (cfr. paragrafo 33) e un gruppo di controllo negativo Per orientamenti sui gruppi di controllo positivi, cfr. paragrafi 26 e 27	
Condizioni di stabulazione e alimentazione		
T° locale di stabulazione	22 °C ± 3 °C	
Umidità relativa	50-60 % non inferiore a 30 % né superiore a 70 %	
Fotoperiodo	12:12 (luce/buio)	
Dieta e acqua da bere	Ad libitum	

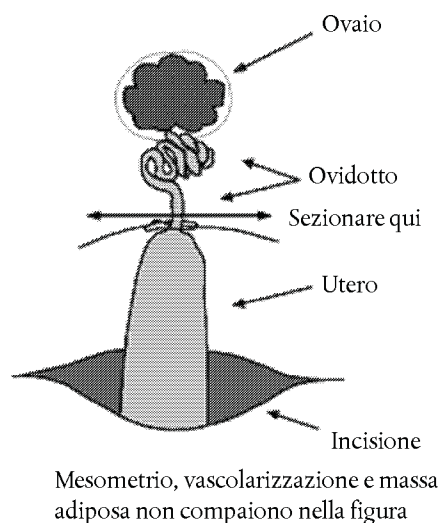
	Ratto	Topo
Stabulazione	Individuale o in gruppi di tre animali al massimo (gabbie collettive raccomandate per gli animali immaturi)	
Dieta e lettiera	Bassi livelli di fitoestrogeni raccomandati nella dieta e nella lettiera	
Protocollo		
Metodo	Metodo con femmine immature non ovariectomizzate (da privilegiare) Metodo con femmine adulte ovariectomizzate	Metodo con femmine adulte ovariectomizzate
Età di trattamento degli animali immaturi	Non prima del 18° giorno postnatale Fine trattamento prima del 25° giorno postnatale	Non pertinente per questo metodo
Età all'ovariectomia	Fra 6 e 8 settimane	
Età di trattamento degli animali ovariectomizzati	Almeno 14 giorni devono intercorrere tra l'ovariectomia e il 1° giorno di somministrazione	Almeno 7 giorni devono intercorrere tra l'ovariectomia e il 1° giorno di somministrazione
Peso corporeo	La variazione del peso corporeo deve essere minima e non superiore a ± 20 % del peso medio	
Dosaggio		
Via di somministrazione	Sonda orogastrica o iniezione sottocutanea	
Frequenza di somministrazione	Dose unica giornaliera	
Volume somministrato per sonda e iniezione	≤ 5 ml/kg peso corporeo (o fino a 10 ml/kg peso corporeo in caso di soluzioni acquose) (in 2 siti di iniezione sottocutanea)	
Durata della somministrazione	3 giorni consecutivi per le femmine immature Almeno 3 giorni consecutivi per le femmine ovariectomizzate	7 giorni consecutivi per le femmine ovariectomizzate
Data dell'autopsia	Circa 24 ore dopo l'ultima dose	
Risultati		
Risposta positiva	Aumento statisticamente significativo del peso uterino medio (umido e/o secco)	
Estrogeno di riferimento	17-α-etinilestradiolo	

ORIENTAMENTI PER L'INTERPRETAZIONE E L'ACCETTAZIONE DEI RISULTATI

54. In genere, una prova per la ricerca di estrogeni è da considerarsi positiva se si constata un aumento statisticamente significativo del peso uterino ($p < 0,05$), almeno nel gruppo trattato con la dose più elevata rispetto al gruppo di controllo con solvente. Il risultato positivo è corroborato dalla dimostrazione di una relazione biologicamente plausibile tra la dose e l'entità della risposta, tenendo presente che la sovrapposizione degli effetti estrogenici e antiestrogenici della sostanza in esame può influire sull'andamento della curva dose-risposta.
55. Per poter interpretare correttamente i dati occorre fare attenzione a non superare la dose massima tollerata, valutando scrupolosamente a tal fine la riduzione del peso corporeo, i segni clinici e altri reperti.

56. Un elemento importante da considerare per l'accettazione dei dati del saggio uterotrofico è il peso uterino del gruppo di controllo trattato con il mezzo disperdente. Se i valori del gruppo di controllo sono elevati possono compromettere la reattività del saggio e la capacità di individuare agonisti degli estrogeni ad azione molto debole. I dati ricavati dalla letteratura e quelli ottenuti durante la convalida del saggio uterotrofico paiono indicare che le medie dei controlli possono essere spontaneamente alte, in particolare negli animali immaturi (2)(3)(6)(9). Poiché il peso uterino delle femmine di ratto immature dipende da molte variabili, come il ceppo o il peso corporeo, non è possibile stabilire un limite massimo preciso per il peso uterino. A titolo indicativo, se il peso uterino secco nei controlli immaturi è compreso tra 40 e 45 mg, i risultati possono essere ritenuti sospetti, e se supera i 45 mg può essere necessario ripetere la prova, valutando comunque caso per caso (3)(6)(8). Nelle prove con femmine di ratto adulte occorre tener presente che se l'ovariectomia è stata incompleta i resti di tessuto ovarico possono produrre estrogeni endogeni e ritardare la regressione del peso uterino.
57. Per i gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente, un peso uterino secco inferiore a 0,09 % del peso corporeo per gli animali immaturi e a 0,04 % per gli animali giovani ovariectomizzati pare dare risultati accettabili [cfr. tabella 31 (2)]. Se il peso uterino dei controlli è superiore a questi valori, occorre verificare vari fattori, in particolare l'età degli animali, l'esito dell'ovariectomia, i fitoestrogeni presenti nella dieta ecc., e un eventuale risultato negativo (nessun indizio di attività estrogenica) deve essere considerato con prudenza.
58. Il laboratorio deve conservare i dati storici riguardanti i gruppi di controllo trattati con il mezzo disperdente, così come i dati storici sugli effetti degli estrogeni di riferimento positivi, come il 17 α -etinilestradiolo. Il laboratorio può anche testare gli effetti di agonisti degli estrogeni di cui è nota la debole attività. Per garantire che i metodi impiegati dal laboratorio siano sufficientemente sensibili, tutti questi dati possono essere confrontati con i dati disponibili (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8).
59. Nello studio di validazione dell'OCSE, la variabilità ponderale si è rivelata minore negli uteri asciutti che in quelli umidi (6) (7). Tuttavia, una risposta significativa nell'uno o nell'altro caso sta a indicare che la sostanza in esame è positiva (vale a dire, esplica attività estrogenica).
60. Sebbene la risposta uterotrofica non sia unicamente d'origine estrogenica, un risultato positivo del saggio uterotrofico deve essere in linea di principio interpretato come prova di attività estrogenica in vivo, e deve normalmente dar luogo a ricerche più approfondite (cfr. paragrafo 9 e appendice 2, in cui figura il "Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino").

Figura 1

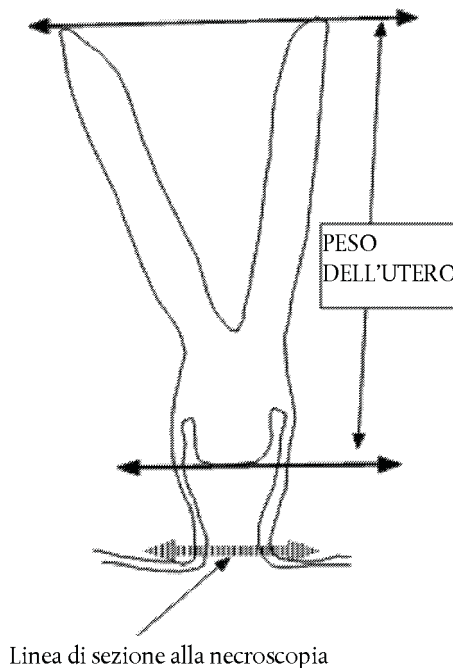
Schema dell'ablazione chirurgica delle ovaie

Si inizia incidendo la zona dorso-laterale della parete addominale nel punto intermedio tra il bordo costale inferiore e la cresta iliaca, a qualche millimetro dal margine laterale del muscolo lombare. Si individuano le ovaie all'interno della cavità addominale. Si rimuovono le ovaie dalla cavità addominale e le si colloca su campo sterile,

si lega il dotto tra l'ovaia e l'utero per fermare l'emorragia e si separa l'ovaia con un'incisione al di sopra della legatura, in corrispondenza della giunzione dell'ovidutto e di ciascun corno uterino. Dopo aver escluso il persistere di un'emorragia importante, si sutura la parete addominale e si richiude la pelle mediante clip o sutura. Prima di utilizzare gli animali, li si lascia ristabilire per almeno 14 giorni affinché il peso dell'utero diminuisca.

Figura 2

Prelievo e preparazione dei tessuti uterini per la pesatura



S'inizia con l'aprire la parete addominale a livello della sinfisi pubica. Si staccano poi entrambe le ovaie, se presenti, e le corna uterine dalla parete addominale dorsale. Si staccano anche la vescica e gli ureteri dal lato ventrale e laterale dell'utero e della vagina. Si scolla il tessuto fibroso del setto retto-vaginale fino a quando si individua la giunzione dell'orifizio vaginale e della cute perineale. Si staccano utero e vagina dal corpo incidendo la parete vaginale appena sopra la giunzione della cute perineale, come illustrato nella figura. L'utero è staccato dal corpo recidendo delicatamente il mesentere nel punto di attacco su tutta la lunghezza della componente dorso-laterale di ciascun corno uterino. Dopo l'asportazione dal corpo, si eliminano il grasso in eccesso e il tessuto connettivo. Se presenti, si staccano le ovaie a livello dell'ovidutto procedendo in modo da evitare la perdita di fluido del lume dal corno uterino. Se l'animale è stato ovariectomizzato, si esaminano i peduncoli per rilevare l'eventuale presenza di tessuto ovarico. Si separa la vagina dall'utero appena sotto la cervice, in modo che quest'ultima resti insieme al corpo dell'utero, come illustrato nella figura. L'utero può a questo punto essere pesato.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Antiestrogenicità: capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività del 17 β -estradiolo nei mammiferi.

Data di nascita: giorno 0 dopo la nascita.

Dosaggio: termine generale che indica la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Dose massima tollerata (MTD): quantità massima di una sostanza chimica che, al momento dell'introduzione nell'organismo, non è fatale per gli animali sperimentali (indicata con LD₀) (IUPAC, 1993).

Dose: quantità di sostanza chimica somministrata. Nel saggio uterotrofico, la dose è espressa come peso della sostanza in esame per unità di peso corporeo dell'animale sperimentale per giorno (ad esempio, mg/kg peso corporeo/giorno).

Estrogenicità: capacità di una sostanza chimica di agire come il 17 β -estradiolo nei mammiferi.

Giorno postnatale X: giorno X di vita dopo il giorno di nascita.

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per verificare la pertinenza di un metodo.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal test. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per verificare la pertinenza di un metodo.

Uterotrofico: termine utilizzato per descrivere un influsso positivo sulla crescita dei tessuti dell'utero.

Validazione: processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un determinato obiettivo.

Appendice 2

Nota: documento preparato dal Segretariato del Programma sulle linee guida, a partire dall'accordo raggiunto alla VI riunione del gruppo di studio sulla sperimentazione e sulla valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (*EDTA Task Force*)

Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino

Livello 1 Selezione e prioritizzazione sulla base delle informazioni disponibili	— proprietà fisiche e chimiche, es. peso molecolare, reattività, volatilità, biodegradabilità, — esposizione degli esseri umani e dell'ambiente, es. volume di produzione, rilascio, modi d'uso — pericoli, es. dati tossicologici disponibili
Livello 2 Saggi <i>in vitro</i> che forniscono dati meccanicistici	— affinità del legame ai recettori degli estrogeni, degli androgeni e degli ormoni tiroidei — attivazione della trascrizione — aromatasi e steroidogenesi <i>in vitro</i> — riconoscimento/fissazione sul recettore degli idrocarburi aromatici — relazioni quantitative struttura-attività (QSARs) — screening preliminari ad alto rendimento — funzione tiroidea — saggio sulla vitellogenina degli epatociti dei pesci — altri (se del caso)
Livello 3 Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a un singolo meccanismo ed effetto endocrino	— saggio sulla vitellogenina degli epatociti dei pesci (estrogeni) — saggio uterotropico(estrogeni) — saggio di Hershberger (androgeni) — funzione ormononale non mediata da recettori — altre funzioni (es. tiroidea)
Livello 4 Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a diversi meccanismi ed effetti endocrini	— saggio istopatologico sulle gonadi dei pesci — saggio sulla metamorfosi delle rane — LG OCSE n. 407 migliorata (endpoint basati su meccanismi endocrini) — saggi sulla pubertà su maschi e femmine — saggio sul maschio adulto intatto
Livello 5 Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a meccanismi endocrini e altri meccanismi	— saggio svolto su una parte o sulla totalità del ciclo di vita di pesci, uccelli, anfibi e invertebrati (sviluppo e riproduzione) — saggio su una generazione (LG n. 415 migliorata)¹ — saggio su due generazioni (LG n. 416 migliorata)¹ — prova di screening per la riproduzione (LG n. 421 migliorata)¹ — studio combinato sulla tossicità a dosi ripetute e di screening della tossicità per la riproduzione e sullo sviluppo (linea guida OCSE n. 422 migliorata)¹ ¹ gli eventuali miglioramenti saranno esaminati dal gruppo di gestione e validazione dei saggi sui mammiferi (VMG mamm)

NOTE RELATIVE AL QUADRO CONCETTUALE

- Nota 1:* è possibile aderire al quadro e discostarsene a partire da qualsiasi livello, in base alla natura delle informazioni necessarie ai fini della valutazione dei rischi e dei pericoli.
- Nota 2:* nel livello 5, l'analisi ecotossicologica deve includere endpoint che evidenzino i meccanismi degli effetti indesiderati nonché dei potenziali danni per la popolazione.
- Nota 3:* se un modello multimodale comprende diversi metodi di prova che forniscono dati su un unico endpoint, tale modello deve sostituire i singoli metodi.
- Nota 4:* ogni sostanza chimica deve essere valutata caso per caso, alla luce di tutte le informazioni disponibili e tenendo presente la funzione dei livelli del quadro.
- Nota 5:* la versione attuale del quadro è da considerarsi esaustiva. Tra le prove che figurano nei livelli 3, 4 e 5, alcune sono già disponibili, altre devono ancora essere convalidate e vi sono incluse provvisoriamente. Saranno confermate una volta messe a punto e convalidate.
- Nota 6:* il livello 5 non è inteso a contenere solo metodi di prova definitivi. I metodi che vi figurano servono ai fini della valutazione generale dei rischi e dei pericoli.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.
- (4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.
- (6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 β -estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science* 118:650-651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369-373.
- (16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.
- (24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320 — 333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33 — 41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288 — 305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 — 291.
- (31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.

- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- (37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
- (38) Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (GU L 276 del 20.10.2010, pag. 33).

B.55. SAGGIO DI HERSHBERGER SUL RATTO: SAGGIO DI SCREENING A BREVE TERMINE DELLE PROPRIETÀ (ANTI) ANDROGENICHE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 441 (2009). Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario per rivedere le linee guida esistenti ed elaborarne di nuove per lo screening e le prove delle sostanze considerate interferenti endocrini potenziali (1). Tra gli elementi su cui si sono concentrati questi lavori figura la messa a punto di una linea guida per il saggio di Hershberger sul ratto. Dopo svariati decenni di utilizzo da parte dell'industria farmaceutica, questo saggio è stato standardizzato per la prima volta nel 1962 da un comitato ufficiale di esperti come strumento di screening delle sostanze chimiche androgeniche (2). Tra il 2001 e il 2007 il saggio è stato sottoposto ad un vasto programma di validazione, che ha incluso la stesura di un documento di revisione (23), un articolo dettagliato sui metodi (3), una guida per la dissezione (21) e intensi studi intra e interlaboratorio, volti a dimostrare l'affidabilità e la riproducibilità del saggio. Tali studi di validazione sono stati condotti con un potente androgeno di riferimento (testosterone propionato, TP), due potenti androgeni sintetici (acetato di trenbolone e metiltestosterone), un potente farmaco antiandrogenico (flutamide), un potente inibitore (finasteride) della sintesi dell'androgeno naturale diidrositestosterone (DHT), vari pesticidi a debole azione antiandrogenica (linuron, vinclozolin, procimidone, p,p'DDE), un potente inibitore della 5 α riduttasi (finasteride) e due sostanze chimiche negative note (dinitrofenolo e nonilfenolo) (4) (5) (6) (7) (8). Questo metodo di prova, oltre ad essere il risultato della lunga esperienza storica nell'uso del saggio, si fonda sull'esperienza acquisita con il programma di validazione della prova e sui relativi risultati.
2. Il saggio di Hershberger è una prova di screening a breve termine in vivo che impiega tessuti accessori dell'apparato genitale maschile. Risale agli anni '30 ed è stato modificato negli anni '40 includendovi i muscoli dell'apparato genitale maschile che rispondono agli androgeni (2) (9-15). Negli anni '60 sono stati valutati oltre 700 potenziali androgeni per mezzo di una versione standardizzata del protocollo (2) (14), ed è in questo periodo che il saggio si configura come metodo standard sia per gli androgeni che per gli antiandrogeni (2) (15). L'attuale versione si basa sulle variazioni di peso di cinque tessuti androgeno-dipendenti nel ratto maschio peripuberale castrato. Esso valuta la capacità di una sostanza chimica di stimolare le attività biologiche analoghe a quelle indotte dagli agonisti e dagli antagonisti degli androgeni o dagli inibitori della 5 α -riduttasi. I cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti esaminati nel presente metodo sono la prostata ventrale, le vescicole seminali (con i relativi fluidi e ghiandole della coagulazione), il muscolo elevatore dell'ano con il bulbocavernoso, la coppia di ghiandole bulbouretrali e il glande. Nel ratto maschio peripuberale castrato questi cinque tessuti rispondono tutti agli androgeni con un aumento del peso assoluto. Se stimolati affinché aumentino di peso mediante somministrazione di un potente androgeno di riferimento, questi cinque tessuti rispondono agli antiandrogeni con una diminuzione del peso assoluto. Il primo modello per questo saggio è il maschio peripuberale castrato chirurgicamente, che è stato convalidato nelle fasi 1, 2 e 3 del programma di validazione di Hershberger.
3. Il saggio di Hershberger è utilizzato come prova meccanicistica di screening in vivo degli agonisti degli androgeni, degli antagonisti degli androgeni e degli inibitori della 5 α -riduttasi e la sua applicazione va vista nel contesto del "Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino" (appendice 2). In questo quadro concettuale il saggio di Hershberger figura al livello 3 come saggio in vivo che fornisce dati riguardo a un unico meccanismo endocrino, ovvero l'attività (anti)androgenica. Questo saggio è destinato a far parte di una batteria di prove in vitro e in vivo concepita per individuare le sostanze chimiche potenzialmente in grado di interagire con il sistema endocrino, e consentire di valutarne i pericoli e i rischi per la salute umana o per l'ambiente.

4. Per evitare la castrazione, in un'ottica di attenzione al benessere degli animali, si è cercato un modello alternativo nel maschio svezzato intatto (non castrato) sottoposto a stimolazione. Il metodo con il maschio svezzato stimolato è stato convalidato (24), sebbene negli studi di validazione questa versione del saggio di Hershberger non sia parsa sempre in grado di evidenziare, alle dosi testate, gli effetti delle sostanze a debole attività antiandrogenica sul peso degli organi androgeno-dipendenti. Questo modello non è stato perciò incluso nel presente metodo di prova. Tuttavia, tenuto conto che il suo uso non solo è positivo in termini di benessere degli animali, ma può anche fornire informazioni su altri modi di azione, esso è illustrato nel documento d'orientamento dell'OCSE n. 115 (25).

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

5. Gli agonisti e gli antagonisti degli androgeni fungono da ligandi dei recettori androgenici e possono, rispettivamente, attivare o inibire la trascrizione del gene regolata dal recettore. Alcune sostanze chimiche, inoltre, inibiscono la conversione del testosterone in diidrotestosterone, l'androgeno naturale più potente, a livello di alcuni tessuti bersaglio degli androgeni (inibitori della 5 α -riduttasi). Tali sostanze possono avere effetti indesiderati sulla salute, in particolare sulla riproduzione e sullo sviluppo. È pertanto necessario, a fini di regolamentazione, potere esaminare e valutare rapidamente l'eventuale attività agonista o antagonista degli androgeni o inibitrice della 5 α -riduttasi, esplicita da una sostanza chimica. Sebbene apporti informazioni utili, l'affinità di un ligando per un recettore androgenico misurata dal suo legame con il recettore oppure l'attivazione della trascrizione di geni reporter in vitro non sono gli unici fattori che possono determinare un eventuale pericolo. Altri determinanti possono essere l'attivazione e la disattivazione metabolica dopo l'ingresso della sostanza chimica nell'organismo, la sua distribuzione nei tessuti bersaglio e l'eliminazione dall'organismo, ed è perciò necessario indagare l'eventuale attività di una sostanza chimica in vivo, in condizioni sperimentali e di esposizione idonee. La valutazione in vivo è meno utile se le caratteristiche chimiche della sostanza relative all'assorbimento, alla distribuzione, al metabolismo e all'eliminazione (ADME) sono note. I tessuti androgeno-dipendenti rispondono con una crescita rapida e vigorosa alla stimolazione con androgeni, in particolare nei ratti maschi prepuberali castrati. I roditori, in particolare il ratto, sono ampiamente utilizzati anche negli studi di tossicità per la caratterizzazione dei pericoli. Pertanto, la versione del saggio che utilizza il ratto prepuberale castrato e i cinque tessuti bersaglio è adatta per lo screening in vivo degli agonisti e degli antagonisti degli androgeni e degli inibitori della 5 α -riduttasi.
6. Il presente metodo di prova si basa sui protocolli impiegati nello studio di validazione dell'OCSE che si sono dimostrati affidabili e riproducibili negli studi intra e interlaboratorio (4)(5)(6)(7)(8). Il presente metodo contempla sia il protocollo per gli androgeni sia quello per gli antiandrogeni.
7. Sebbene nel programma di validazione dell'OCSE del saggio di Hershberger la dose di TP utilizzata dai vari laboratori non fosse la stessa (0,2 e 0,4 mg/kg/giorno, per iniezione sottocutanea), poche sono le differenze constatate nella capacità di queste due varianti del protocollo di rilevare l'attività antiandrogenica, sia debole che forte. È però evidente che la dose di TP non deve essere troppo elevata da bloccare gli effetti degli antagonisti deboli dei recettori per gli androgeni o troppo bassa da indurre una crescita scarsa dei tessuti androgenici, anche senza concomitante somministrazione di antiandrogeni.
8. La crescita dei tessuti androgeno-dipendenti non è una risposta unicamente di origine androgenica; anche altri fattori, diversi dagli agonisti degli androgeni, possono alterare il peso di alcuni tessuti. La crescita simultanea di vari tessuti corrobora però l'ipotesi di un meccanismo più specifico di natura androgenica. Ad esempio, somministrando dosi elevate di estrogeni potenti si è osservato un aumento ponderale delle vescicole seminali, ma non degli altri tessuti androgeno-dipendenti. Le sostanze chimiche antiandrogeniche possono fungere da antagonisti dei recettori per gli androgeni oppure da inibitori della 5 α -riduttasi. L'effetto prodotto dagli inibitori della 5 α -riduttasi è variabile, perché la conversione nel più potente diidrotestosterone dipende dal tipo di tessuto. Gli antiandrogeni che inibiscono la 5 α — riduttasi, come la finasteride, hanno effetti più marcati nella prostata ventrale rispetto a un potente antagonista di recettori per gli androgeni, come il flutamide. Questa differenza di risposta dei tessuti può servire per distinguere i modi di azione mediati dai recettori androgenici da quelli mediati dalla 5 α -riduttasi. Inoltre, il recettore dell'androgeno è imparentato, in termini di evoluzione, con quello di altri ormoni steroidei, e vi sono alcuni altri ormoni che, se somministrati a dosi elevate suprafisiologiche, possono legarsi con esso e contrastare gli effetti d'attivazione della crescita indotti dal TP (13). È altresì plausibile che un metabolismo steroideo più intenso e il conseguente calo del tenore sierico di testosterone possano ridurre la crescita dei tessuti androgeno-dipendenti. Pertanto, l'esito positivo del saggio di Hershberger deve di norma essere valutato adottando un approccio basato sulla forza probante dei dati, che prevede saggi in vitro, quali i saggi di legame al recettore estrogenico e al recettore androgenico e relativi saggi di attivazione della trascrizione, altri saggi in vivo che esaminano analoghi tessuti bersaglio degli androgeni, come il saggio sul maschio in età puberale, il saggio di 15 giorni sul maschio adulto intatto o gli studi a dosi ripetute su 28 o 90 giorni.

9. L'esperienza mostra che gli androgeni xenobiotici sono più rari degli antiandrogeni xenobiotici. Si prevede quindi che il saggio di Hershberger sia utilizzato principalmente per lo screening degli antiandrogeni, sebbene se ne possa raccomandare l'applicazione anche agli androgeni nel caso delle sostanze chimiche steroidee o sostanze analoghe agli steroidi, come pure per le sostanze chimiche per le quali i metodi dei livelli 1 o 2 del quadro concettuale (appendice 2) hanno indicato possibili effetti androgenici. Analogamente, le prove di livello 5 permettono di osservare effetti indesiderati associati a profili (anti)androgenici, il che comporta la necessità di valutare se la sostanza chimica in causa agisce per via endocrina.
10. Tutti i protocolli che prevedono l'uso di animali rispetteranno le norme locali in materia di benessere animale; le descrizioni delle cure e del trattamento che figurano in appresso costituiscono norme minime, alle quali si sostituiranno le regolamentazioni locali, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (26). Ulteriori orientamenti relativi al trattamento degli animali nel rispetto delle norme etiche sono stati formulati dall'OCSE (17).
11. Come per ogni saggio che utilizza animali da esperimento, occorre valutare attentamente la necessità di effettuare il presente studio. Fondamentalmente sono due le ragioni che possono giustificare tale decisione:
 - potenziale di esposizione elevato (livello 1 del quadro concettuale) oppure elementi indicanti attività (anti) androgenica ricavati da saggi in vitro (livello 2), tali da rendere necessario investigare se tali effetti si possono produrre in vivo;
 - effetti di natura (anti)androgenica in saggi in vivo di livello 4 o 5, tali da rendere necessario investigare il modo d'azione specifico, ad esempio, per determinare se gli effetti sono dovuti a un meccanismo (anti)androgenico.
12. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

13. La sensibilità del saggio di Hershberger si fonda sull'utilizzazione di maschi con produzione minima di androgeni endogeni. A tal fine si impiegano animali castrati, lasciando trascorrere un periodo dalla castrazione che permetta ai tessuti bersaglio di tornare a un peso di riferimento minimo e uniforme. Pertanto, quando si ricerca una potenziale attività androgenica, i livelli endogeni di androgeni in circolazione sono bassi, l'asse ipotalamo-ipofisario-gonadico è incapace di compensarli con meccanismi di retroregolazione, la capacità di risposta dei tessuti è massima e la variabilità del peso iniziale dei tessuti è minima. Quando si ricerca una potenziale attività antiandrogenica, si ottiene un maggior aumento ponderale dei tessuti se li si stimola con un androgeno di riferimento. Il saggio di Hershberger richiede quindi solo 6 animali per gruppo-dose, mentre per altri saggi che utilizzano maschi puberali o adulti intatti il numero consigliato è di 15 maschi per gruppo-dose.
14. La castrazione dei ratti maschi in età peripuberale deve essere fatta in modo idoneo, con l'impiego di tecniche autorizzate di anestesia e asepsi. Per eliminare i disturbi post operatori, nei primi giorni successivi all'intervento si somministrano analgesici. La castrazione migliora la precisione con la quale il saggio rileva gli androgeni e gli antiandrogeni deboli, sopprimendo, innanzitutto, i meccanismi compensatori di retroregolazione endocrina che esistono nell'animale intatto e che possono attenuare gli effetti degli androgeni e degli antiandrogeni somministrati, in secondo luogo eliminando la grande variabilità del tenore sierico di testosterone da un individuo all'altro. Pertanto, la castrazione riduce il numero di animali necessari per ricercare le attività endocrine in oggetto.
15. Nello screening di un'attività androgenica potenziale, la sostanza in esame è somministrata ogni giorno, per un periodo di 10 giorni consecutivi, tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Le sostanze in esame sono somministrate ad almeno due gruppi di animali da esperimento, esponendo ogni gruppo a un livello di dose. Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Un aumento ponderale statisticamente significativo di due o più organi bersaglio nei gruppi che ricevono la sostanza rispetto al gruppo di controllo che riceve il mezzo disperdente è indice di attività androgenica potenziale della sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 60). Gli androgeni come il trenbolone, che non subiscono l'azione della 5 α -riduttasi, producono effetti più pronunciati sul muscolo elevatore dell'ano, sul bulbocavernoso e sul glande rispetto al TP, sebbene un accrescimento debba rilevarsi in tutti i tessuti.
16. Nello screening di un'attività antiandrogenica potenziale, la sostanza in esame è somministrata ogni giorno, per un periodo di 10 giorni consecutivi, tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea, insieme a dosi

giornaliere di TP (0,2 o 0,4 mg/kg/giorno) per iniezione sottocutanea. Dato che il programma di validazione ha dimostrato l'efficacia di entrambe le suddette dosi di TP nella ricerca di antiandrogeni, il saggio va effettuato scegliendo una delle due. La sostanza in esame è somministrata in dosi scalari ad almeno tre gruppi di animali, esponendo ogni gruppo a un livello di dose. Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Un calo ponderale statisticamente significativo di due o più organi bersaglio nei gruppi che ricevono la sostanza e il TP, rispetto al gruppo di controllo che riceve solo TP, è indice di attività antiandrogenica potenziale della sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 61).

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione della specie e del ceppo

17. L'uso del ratto come specie di routine per il saggio di Hershberger risale agli anni '30. Benché sul piano biologico sia plausibile che il ratto e il topo rispondano in modo simile, nel saggio di Hershberger si preferisce utilizzare il ratto proprio grazie ai 70 anni di esperienza acquisita con questo modello. Inoltre, poiché i dati del saggio di Hershberger possono servire da risultati preliminari per uno studio multigenerazionale a lungo termine, è possibile utilizzare animali della stessa specie, dello stesso ceppo e della stessa provenienza in entrambi gli studi.
18. Questo protocollo lascia al laboratorio la facoltà di scegliere il ceppo di ratto da utilizzare nel saggio, che sarà in genere quello da esso abitualmente impiegato. Si possono scegliere i ceppi di ratto di uso comune nei laboratori, evitando però i ceppi che giungono a maturità oltre il 42° giorno di vita, dato che la castrazione dei maschi al 42° giorno può impedire la determinazione del peso del glande, che può essere effettuata soltanto dopo la separazione del prepuzio dal corpo del pene. Salvo in rare eccezioni, non si utilizzano pertanto i ceppi derivati dal ratto Fisher 344, il cui sviluppo sessuale ha una cronologia diversa da quella degli altri ceppi usati più comunemente, come Sprague Dawley o Wistar (16). Se vi è la necessità di utilizzare questo ceppo, il laboratorio dovrà castrare gli individui ad un'epoca leggermente posteriore e dimostrare la sensibilità del ceppo utilizzato. Il laboratorio deve motivare con chiarezza la scelta del ceppo di ratto. Se il saggio di screening è preliminare a uno studio a dose ripetuta per via orale, a uno studio sulla riproduzione e sullo sviluppo, o a uno studio a lungo termine, occorre usare di preferenza, in tutti gli studi, animali provenienti dallo stesso ceppo e aventi la medesima origine.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

19. Tutte le procedure devono essere conformi agli standard locali in materia di cura degli animali sperimentali. Le cure e il trattamento qui descritti costituiscono norme minime alle quali si sostituiranno regolamentazioni locali più rigorose, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (26). La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve mantenersi intorno al 50-60 %; in ogni caso non deve essere inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale con un fotoperiodo di 12:12 (luce/buio).
20. La stabulazione in gabbie collettive è preferibile all'isolamento a causa della giovane età degli animali e per il fatto che i ratti sono animali socievoli. Alloggiando due o tre animali per gabbia si evita l'affollamento e lo stress che ne deriva e che può interferire con la regolazione ormonale dello sviluppo del tessuto sessuale accessorio. Le gabbie devono essere accuratamente pulite per eliminare i possibili contaminanti e sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. La scelta di gabbie di congrue dimensioni (circa 2 000 cm²) eviterà l'affollamento.
21. Ogni animale è identificato individualmente (ad esempio, con un marchio o un'etichetta sull'orecchia) con metodo non cruento. Il metodo di identificazione deve essere indicato nella relazione.
22. Gli animali ricevono a volontà dieta da laboratorio e acqua da bere. Il laboratorio utilizza nel saggio di Hershberger la dieta da laboratorio che normalmente impiega nella sperimentazione sulle sostanze chimiche. Negli studi di validazione del saggio, non sono stati osservati effetti né variabilità imputabili alla dieta. Il tipo di dieta utilizzata deve essere indicata nella relazione e un campione del mangime somministrato deve essere conservato per eventuali analisi che potrebbero essere necessarie in un secondo tempo.

Criteri di prestazione relativi al peso degli organi androgeno-dipendenti

23. Durante lo studio di validazione non è emerso alcun dato comprovante che un calo del peso corporeo incida sull'aumento o sulla diminuzione della crescita ponderale dei tessuti bersaglio (ossia, dei tessuti che devono essere pesati nel presente studio).

24. Tra i vari ceppi di ratto utilizzati con successo nel programma di validazione, il peso degli organi androgeno-dipendenti era più elevato nei ceppi più corpulenti che in quelli più leggeri. Pertanto, i criteri di prestazione del saggio di Hershberger non comprendono il peso assoluto degli organi previsto per i controlli negativi e positivi.
25. Poiché il coefficiente di variazione (CV) per un tessuto è inversamente proporzionale alla potenza statistica, i criteri di prestazione del saggio di Hershberger sono basati su valori massimi di CV per ogni tessuto (tabella 1). I CV sono tratti dagli studi di validazione dell'OCSE. In caso di esito negativo, il laboratorio deve esaminare i CV del gruppo di controllo e del gruppo trattato con la dose più elevata per determinare se sono stati superati i criteri di prestazione relativi al CV massimo.
26. Lo studio dovrà essere ripetuto quando: 1) almeno tre dei dieci possibili CV individuali nel gruppo di controllo e in quello trattato con la dose elevata superano i valori massimi indicati nella tabella 1 per gli studi sugli agonisti e sugli antagonisti; e 2) almeno due tessuti bersaglio sono marginalmente non significativi, ossia, presentano valori r compresi tra 0,05 e 0,10.

Tabella 1

CV massimi ammessi, determinati per i tessuti sessuali accessori bersaglio nel modello animale castrato negli studi di validazione dell'OCSE ⁽¹⁾

Tessuto	Effetti antiandrogenici	Effetti androgenici
Vescicole seminali	40 %	40 %
Prostata ventrale	40 %	45 %
Muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso	20 %	30 %
Ghiandole bulbouretrali	35 %	55 %
Glande	17 %	22 %

PROTOCOLLO

Rispetto della normativa e verifica del laboratorio

27. A differenza del saggio uterotrofico (capitolo B.54 del presente allegato), per il saggio di Hershberger non è necessario dimostrare la competenza del laboratorio prima dell'inizio dello studio, perché il saggio prevede l'esecuzione concomitante di una prova di controllo positivo (testosterone propionato e flutamide) e negativo.

Numero e condizione degli animali

28. Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 6 animali. Ciò vale sia per il protocollo androgenico che per quello antiandrogenico.

Castrazione

29. Dopo il ricevimento degli animali, occorre prevedere un periodo di acclimatazione iniziale di svariati giorni, per assicurarsi che siano sani e vitali. Poiché gli animali castrati prima del 42° giorno di età o il 42° giorno postnatale non sempre presentano separazione prepuziale, la castrazione deve essere effettuata il 42° giorno postnatale o successivamente, ma non prima. Gli animali sono castrati sotto anestesia, incidendo lo scroto e asportando entrambi i testicoli e gli epididimi, con legamento dei vasi sanguigni e dei dotti deferenti. Dopo aver escluso la presenza di emorragia, si chiude lo scroto con sutura o clip. Per alleviare i disturbi post operatori, nei primi giorni successivi all'intervento si somministrano analgesici. Se gli animali sono acquistati già castrati da un fornitore, quest'ultimo ne garantirà l'età e lo stadio di maturazione sessuale.

⁽¹⁾ Il CV massimo per ciascun tessuto è stato determinato in base a un grafico dei valori CV — disposti in ordine crescente — che riprende tutte le medie di tutti gli esperimenti condotti nell'esercizio di validazione utilizzando un determinato modello (agonista o antagonista). Si è considerato che il CV massimo corrispondesse al punto, detto valore soglia, a partire dal quale gli incrementi tra i CV immediatamente più alti della serie diventavano nettamente maggiori di quelli esistenti tra i CV immediatamente anteriori della serie. Va osservato che, sebbene questa analisi abbia consentito di individuare valori soglia relativamente affidabili per il modello antagonista del saggio, le curve del CV nel saggio sugli agonisti hanno mostrato incrementi più uniformi, per cui i CV massimi identificati con tale metodo sono alquanto arbitrari.

Acclimatazione dopo la castrazione

30. Il periodo di acclimatazione degli animali alle condizioni di laboratorio è di almeno 7 giorni dopo la castrazione, per permettere la regressione ponderale dei tessuti bersaglio. Gli animali sono osservati quotidianamente e quelli che mostrano segni di malattia o anomalie fisiche sono ritirati. La somministrazione delle dosi allo studio può quindi iniziare a partire dal 49° giorno d'età, ma non oltre il 60°. Al momento dell'autopsia l'animale non deve avere più di 70 giorni. Questo grado di flessibilità consente al laboratorio una programmazione efficiente del proprio lavoro sperimentale.

Peso corporeo e randomizzazione dei gruppi

31. Le differenze del peso corporeo individuale sono una fonte di variabilità del peso tissutale, sia all'interno che tra i gruppi di animali. Una grande variabilità del peso dei tessuti si traduce in un maggiore coefficiente di variazione (CV) e in una minore potenza statistica del saggio (talvolta denominata "sensibilità del saggio"). È pertanto opportuno limitare le variazioni del peso corporeo, sia sul piano sperimentale che su quello statistico.
32. Sul piano sperimentale, occorre sforzarsi di ridurre le variazioni del peso corporeo all'interno e tra i gruppi in esame. In primo luogo, gli animali di taglia fuori norma non devono partecipare allo studio di coorte. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali non superano $\pm 20\%$ del peso medio (ad esempio, $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$ per i ratti peripuberali castrati). In secondo luogo, gli animali sono assegnati ai gruppi (di controllo e di trattamento) in maniera aleatoria, in modo che non vi sia alcuna differenza statistica tra il peso corporeo medio dei vari gruppi. Occorre indicare nella relazione il protocollo di randomizzazione a blocchi utilizzato.
33. Poiché la tossicità può ridurre il peso corporeo dei gruppi trattati rispetto a quello del gruppo di controllo, è possibile impiegare come covariabile statistica il peso corporeo rilevato il primo giorno di somministrazione della sostanza chimica in esame, e non il peso corporeo al momento dell'autopsia.

Dosaggio

34. Per stabilire se una sostanza chimica può avere un'azione androgenica in vivo, in genere è sufficiente allestire due gruppi-dose della sostanza in esame, un gruppo di controllo positivo e un gruppo di controllo del mezzo disperdente (negativo) (cfr. paragrafo 43): è questo il disegno sperimentale da preferirsi per motivi dettati dal benessere degli animali. Se lo scopo è di ottenere una curva della relazione dose-risposta o di estrapolare i risultati per applicarli a dosi più basse, sono necessari almeno 3 gruppi-dose. Se si desidera ottenere informazioni più particolareggiate sull'attività androgenica (quali una stima dell'efficacia) occorre prevedere un altro schema di dosaggio. Se lo studio verte sugli antiandrogeni, la sostanza chimica in esame viene somministrata insieme a un agonista dell'androgeno di riferimento. Si utilizzano almeno 3 gruppi sperimentali con diverse dosi della sostanza in esame, un controllo positivo e un controllo negativo (cfr. paragrafo 44). Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza da esaminare, gli animali del gruppo di controllo devono essere manipolati in modo identico a quelli dei gruppi che ricevono il trattamento. Se la sostanza è somministrata con un mezzo disperdente, il volume del mezzo disperdente somministrato al gruppo di controllo sarà quello massimo utilizzato per i gruppi-dose.
35. Tutti i livelli di dose devono essere proposti e scelti tenendo conto degli eventuali dati esistenti sulla tossicità e sulla (tossico-)cinetica della sostanza in esame o di sostanze affini. Il livello di dose più elevato deve essere stabilito innanzitutto in base alla DL_{50} e/o alle informazioni sulla tossicità acuta, onde evitare il decesso, sofferenze gravi o distress degli animali (17)(18)(19)(20) e, in secondo luogo, tenendo conto delle informazioni disponibili sulle dosi utilizzate negli studi subcronici e cronici. In generale, la dose più elevata non deve provocare una riduzione del peso corporeo finale degli animali superiore al 10% del peso dei controlli. La dose più elevata equivale alla dose inferiore tra le due seguenti: 1) la dose più elevata che garantisce la sopravvivenza dell'animale e che non induce tossicità né distress significativi dopo 10 giorni consecutivi di somministrazione, fino ad una dose massima di $1\ 000\text{ mg/kg/giorno}$ (cfr. paragrafo 36); 2) una dose che induce effetti (anti)androgenici. Per uno screening, sono ammessi intervalli ampi tra i livelli di dose (ad esempio, mezza unità logaritmica, che equivale a un fattore di progressione di 3,2, o persino 1 unità logaritmica). In mancanza di dati utili al riguardo, si può condurre uno studio per identificare il range di dosi utilizzabili (cfr. paragrafo 37).

Dose limite

36. Se in un saggio, condotto secondo i protocolli descritti per il presente studio, la dose limite di $1\ 000\text{ mg/kg}$ di peso corporeo al giorno e una dose inferiore non producono cambiamenti statisticamente significativi nel peso degli organi sessuali, si può ritenere inutile analizzare altri livelli di dose. Il concetto di dose limite si applica in tutti i casi tranne quando i dati sull'esposizione umana indicano la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

Studio per la determinazione del range di dosi

37. Se necessario, è possibile effettuare uno studio preliminare con pochi animali per individuare il range di dosi e scegliere così i gruppi-dose appropriati [avvalendosi dei metodi per le prove di tossicità acuta, di cui ai capitoli B.1 bis, B.1 ter del presente allegato (27), e alla linea guida OCSE n. 425 (19)]. L'obiettivo, nel caso di un saggio di Hershberger, è di scegliere delle dosi che garantiscano la sopravvivenza degli animali e non inducano tossicità né distress significativi dopo dieci giorni consecutivi di somministrazione della sostanza chimica, fino a una dose limite di 1 000 mg/kg/giorno, come indicato nei paragrafi 35 e 36. A tale riguardo, può essere utile consultare il documento di orientamento dell'OCSE (17), che definisce i segni clinici di tossicità o distress negli animali. Se tale studio preliminare lo consente, dopo dieci giorni di trattamento i tessuti bersaglio possono essere escissi e pesati a circa 24 ore dall'ultima dose. Tali dati potrebbero poi essere utilizzati per facilitare la scelta delle dosi nello studio principale.

Sostanze chimiche di riferimento e mezzo disperdente

38. L'agonista androgenico di riferimento è il testosterone propionato (TP), n. CAS 57-82-5. La dose di TP di riferimento è pari a 0,2 o 0,4 mg/kg di peso corporeo/giorno. L'antagonista androgenico di riferimento è il flutamide (FT), n. CAS 1311-84-7. La dose di FT di riferimento è pari a 3 mg/kg di peso corporeo/giorno, da somministrare insieme alla dose di TP riferimento.
39. Si raccomanda di considerare in primo luogo, ogniqualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa. Dato però che molti ligandi degli androgeni o i loro precursori metabolici tendono ad essere idrofobi, normalmente si utilizza una soluzione/sospensione oleosa (ad esempio, olio di mais, di arachidi, di sesamo o d'oliva). Le sostanze in esame possono essere disciolte in una quantità minima di etanolo 95 % o di altri solventi idonei, poi diluite nel mezzo disperdente prescelto alle concentrazioni finali desiderate. Le caratteristiche tossiche del solvente devono essere note e testate su un gruppo di controllo a parte trattato unicamente con il solvente. Se la sostanza in esame è considerata stabile, se ne può favorire la solubilizzazione riscaldandola leggermente e sottoponendola ad una azione meccanica vigorosa. È necessario determinare la stabilità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente. Se la sostanza in esame rimane stabile per tutta la durata dello studio, se ne prepara inizialmente un'aliquota, dopodiché giorno per giorno si preparano le diluizioni specifiche, facendo attenzione a che i campioni non vengano contaminati e deteriorati.

Somministrazione delle dosi

40. Il TP è somministrato per iniezione sottocutanea, e il FT mediante sonda orogastrica.
41. La sostanza chimica è somministrata tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Quando si sceglie la via di somministrazione occorre tener conto sia del benessere degli animali sia delle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame. Inoltre, nel caso si ottengano risultati positivi per iniezione, prima di avviare una ricerca approfondita a lungo termine, vanno considerati vari aspetti tossicologici, quali l'attinenza con la via di esposizione umana alla sostanza chimica (sonda orogastrica per un'esposizione tramite ingestione, iniezione sottocutanea per un'esposizione mediante inalazione o assorbimento cutaneo), così come le informazioni tossicologiche e i dati metabolici e cinetici (ad esempio, la necessità di evitare il metabolismo di primo passaggio, una migliore efficacia di una determinata via di somministrazione).
42. Gli animali ricevono le dosi alla stessa maniera e secondo la stessa cronologia, per dieci giorni consecutivi, a intervalli di circa 24 ore. Il livello di dosaggio è regolato tutti i giorni in base alle pesate giornaliere simultanee degli animali. Ogni giorno di esposizione si annotano il volume e l'ora della somministrazione della dose. Per poter interpretare correttamente i dati occorre fare attenzione a non superare la dose massima indicata al paragrafo 35, valutando scrupolosamente a tal fine tutti gli elementi osservati, in particolare la riduzione del peso corporeo e i segni clinici. La somministrazione orale forzata è effettuata mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale e dalle linee guida locali sulla cura degli animali, ma in ogni caso non deve essere superiore a 5 ml/kg di peso corporeo, salvo nel caso di soluzioni acquose, delle quali se ne possono somministrare 10 ml/kg di peso corporeo. Per quanto riguarda le iniezioni sottocutanee, le dosi sono iniettate nella regione dorsoscapolare o lombare con ago sterile (di calibro 23 o 25) e una siringa da insulina. La rasatura del sito di iniezione è facoltativa. Le eventuali perdite e fuoriuscite di liquido al momento dell'iniezione o una somministrazione incompleta devono essere registrate. Il volume complessivo giornaliero iniettato per ratto non supera 0,5 ml/kg di peso corporeo.

Protocollo specifico per gli agonisti degli androgeni

43. Nella prova per gli agonisti degli androgeni, il mezzo disperdente è il controllo negativo e il gruppo trattato con il TP è il controllo positivo. L'attività biologica analoga a quella indotta dagli agonisti degli androgeni si ricerca somministrando una sostanza chimica ai gruppi prescelti, alle dosi prescelte, per 10 giorni consecutivi. Il peso dei cinque tessuti sessuali accessori dei gruppi che ricevono la sostanza in esame è paragonato a quello del gruppo che riceve il mezzo disperdente al fine di determinare aumenti di peso statisticamente significativi.

Protocollo specifico per gli antagonisti degli androgeni e gli inibitori della 5 α -reduttasi

44. Nella prova per gli antagonisti degli androgeni e gli inibitori della 5 α -reduttasi, il gruppo trattato con il TP è il controllo negativo e il gruppo trattato simultaneamente con dosi di riferimento di TP e FT è il controllo positivo. L'attività biologica analoga a quella indotta dagli antagonisti degli androgeni e dagli inibitori della 5 α -reduttasi si ricerca somministrando la dose di riferimento di TP e la sostanza chimica per 10 giorni consecutivi. Il peso dei cinque tessuti sessuali accessori dei gruppi che ricevono il TP e la sostanza in esame è paragonato a quello del gruppo che riceve solo il TP di riferimento al fine di determinare diminuzioni di peso statisticamente significative.

OSSERVAZIONI**Osservazioni cliniche**

45. Almeno una volta al giorno si eseguono osservazioni cliniche generali, con più frequenza se si constatano segni di tossicità. Le osservazioni sono effettuate di preferenza alla stessa ora e tenendo conto del momento in cui si prevede che gli effetti siano più evidenti dopo la somministrazione delle dosi. Tutti gli animali sono osservati per controllare la mortalità, la morbidità e segni clinici generali quali alterazioni del comportamento, della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, comparsa di secrezioni ed escrezioni e l'attività autonoma (ad esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, alterazioni della respirazione).
46. Gli animali trovati morti sono rimossi ed eliminati senza ulteriore analisi dei dati. La mortalità, di qualsiasi natura, degli animali prima dell'autopsia va indicata nella relazione insieme alle eventuali cause apparenti. Gli animali moribondi devono essere soppressi con metodi non cruenti e riportati nella relazione, insieme alle cause apparenti della morbidità.

Peso corporeo e consumo alimentare

47. Tutti gli animali sono pesati quotidianamente (peso espresso in grammi, arrotondato al primo decimale), a partire da appena prima l'inizio del trattamento, ossia al momento dell'assegnazione degli animali ai gruppi. A titolo facoltativo, si può misurare anche la quantità di cibo consumata durante il periodo del trattamento in ciascuna gabbia, pesando i contenitori di cibo. I dati sul consumo alimentare sono espressi in grammi per ratto al giorno.

Dissezione e pesatura dei tessuti e degli organi

48. Circa 24 ore dopo l'ultima somministrazione della sostanza chimica in esame, i ratti sono sacrificati e dissanguati, secondo le normali procedure del laboratorio che esegue la prova, e sottoposti ad autopsia. Il metodo impiegato per l'eutanasia è riportato nella relazione del laboratorio.
49. Idealmente, l'ordine nel quale i gruppi di animali sono sottoposti ad autopsia è aleatorio e non segue l'ordine crescente o decrescente delle dosi, perché ciò potrebbe influire sui dati. Il reperto dell'autopsia, vale a dire, alterazioni patologiche/lesioni visibili, va riferito nella relazione.
50. Si pesano i cinque tessuti androgeno-dipendenti (prostata ventrale, vescicole seminali, muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso, coppia di ghiandole bulbouretrali, glande). Per fare ciò, i tessuti sono escissi, accuratamente liberati da eventuali tessuti aderenti e grasso in eccesso e sono pesati (peso fresco dei tessuti non fissati). Ogni tessuto deve essere manipolato con particolare cura per evitare perdita di fluidi e disidratazione, che potrebbero introdurre errori significativi e variabilità facendo risultare un peso inferiore. Alcuni di questi tessuti possono

essere molto piccoli o difficili da dissezionare, il che dà luogo a variabilità. È quindi importante che chi effettua la dissezione dei tessuti sessuali accessori ne conosca bene la procedura standard. L'OCSE ha pubblicato un manuale di procedura operativa standard (SOP) per la dissezione (21) e una formazione rigorosa basata sulla suddetta procedura servirà a limitare una delle potenziali cause di variazione nello studio. Per evitare differenze nel trattamento dei tessuti, l'ideale sarebbe che ciascun tipo di tessuto fosse trattato dallo stesso dissettore. Se ciò non è possibile, l'autopsia deve essere allestita in modo da assegnare a ciascun dissettore la dissezione di un tipo tessuto in tutti i gruppi di trattamento, e non invece di tutti i tessuti di un gruppo di controllo o di un gruppo trattato. Ogni tessuto sessuale accessorio di ciascun animale è pesato senza essere prima tamponato e annotato, e il peso è espresso in mg arrotondato al primo decimale.

51. Alcuni di questi tessuti possono essere molto piccoli o difficili da sezionare, il che dà luogo a variabilità. Precedenti lavori hanno indicato che l'intervallo dei coefficienti di variazione (CV) dipende dalla competenza del laboratorio. In qualche caso all'interno dello stesso laboratorio si sono riscontrate grandi differenze tra il peso assoluto dei tessuti, in particolare la prostata ventrale e le ghiandole bulbouretrali.
52. Il peso del fegato, dei due reni e delle due ghiandole surrenali è una misurazione facoltativa. Anche questi tessuti vanno liberati da eventuali tessuti connettivali e dal grasso. Il peso del fegato è riferito in grammi, arrotondato al primo decimale, mentre quello della coppia di reni e di ghiandole surrenali è riferito in mg, arrotondato al primo decimale. Il fegato, il rene e le ghiandole surrenali non solo risentono dell'azione degli androgeni, ma forniscono anche indizi utili sulla tossicità sistemica.
53. La misura dei livelli sierici di ormone luteinizzante (LH), ormone follicolo-stimolante (FSH) e testosterone (T) è facoltativa. I livelli sierici di testosterone sono utili per determinare se la sostanza in esame induce metabolismo epatico del testosterone, che ne fa abbassare i livelli sierici. Senza i dati relativi al testosterone, questo effetto potrebbe essere imputato a un meccanismo antiandrogenico. I livelli di LH forniscono informazioni sulla capacità di un antiandrogeno di ridurre non solo il peso degli organi, ma anche di influire sulla funzione ipotalamo-pituitaria, il che, secondo studi a lungo termine, può causare tumori ai testicoli. L'FSH è un ormone importante per la spermatogenesi. La misura dei livelli sierici di T4 e T3, anch'essa facoltativa, può fornire informazioni supplementari utili sulla capacità di interferire con l'omeostasi degli ormoni tiroidei. Per misurare i livelli ormonali, si anestetizza il ratto prima dell'autopsia per prelevare il sangue mediante puntura cardiaca, scegliendo accuratamente il protocollo di anestesia affinché non influisca sulla misurazione degli ormoni. Occorre indicare nella relazione il metodo di preparazione del siero, la provenienza dei kit per il dosaggio radioimmunologico o per altre tecniche di misurazione, i protocolli analitici e i risultati ottenuti. I livelli di LH e i livelli di testosterone sono espressi in ng/ml di siero.
54. La dissezione dei tessuti, descritta di seguito, si basa su un manuale dettagliato sull'argomento, corredato di foto, pubblicato come supplemento del programma di validazione (21). Dalla pagina web della Food and Drug Administration coreana si può inoltre accedere a un video che presenta la procedura (22).
 - Con la superficie ventrale dell'animale rivolta verso l'alto, determinare se il prepuzio del pene si è separato dal glande. In tal caso, ritrarre il prepuzio e asportare il glande, pesarlo e annotare il peso (in mg arrotondato al primo decimale);
 - aprire la pelle e la parete addominale, in modo da esporre i visceri. Se si devono pesare anche gli organi facoltativi, asportare e pesare il fegato (valore espresso in grammi al primo decimale), asportare lo stomaco e gli intestini, asportare e pesare la coppia di reni e la coppia di ghiandole surrenali (peso espresso in mg al primo decimale). Questa dissezione espone la vescica e costituisce l'inizio della dissezione dei tessuti sessuali maschili accessori oggetto del presente saggio.
 - Per sezionare la prostata ventrale, separare la vescica dalla lamina muscolare ventrale tagliando il tessuto connettivo lungo la linea mediana. Spostare la vescica in avanti verso le vescicole seminali, in modo da scoprire il lobo sinistro e quello destro della prostata ventrale (ricoperti da uno strato di grasso). Grattare con cura il grasso da entrambi i lobi della prostata ventrale. Spostare delicatamente il lobo destro della prostata ventrale dall'uretra e reciderlo. Tenendo fermo il lobo destro della prostata ventrale, spostare delicatamente il lobo sinistro dall'uretra e reciderlo; pesare e annotare il peso, in mg arrotondato al primo decimale.
 - Per sezionare la vescicola seminale con le ghiandole della coagulazione, spostare la vescica in direzione caudale, in modo da esporre il dotto deferente, il lobo destro e quello sinistro delle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione. Impedire la perdita di fluido applicando una pinza emostatica (clampaggio) alla base delle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, nel punto in cui il dotto deferente si unisce all'uretra. Recidere con cautela le vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, mantenendo in posizione la pinza emostatica, eliminare il grasso e gli annessi, collocarle in una navicella per pesata tarata, ritrarre la pinza emostatica e pesare, annotando poi il peso, espresso in mg al primo decimale.

- Per sezionare il complesso formato dal muscolo elevatore dell'ano con il muscolo bulbocavernoso, è necessario esporre questi muscoli e la base del pene. L'elevatore dell'ano avvolge il colon, mentre i suoi fasci anteriori e il muscolo bulbocavernoso sono attaccati ai bulbi del pene. Asportare la pelle e gli annessi dalla regione perianale che si estende dalla base del pene all'estremità anteriore della ano. Recidere gradualmente il bulbocavernoso dal bulbo del pene e dai tessuti. Tagliare il colon in due, in modo da poter così recidere e asportare l'intera muscolatura formata dall'elevatore dell'ano e dal bulbocavernoso. Dopo averli ripuliti dal grasso e dagli annessi, pesare i muscoli, annotando poi il peso, espresso in mg al primo decimale.
 - Dopo l'asportazione della muscolatura formata dall'elevatore dell'ano e dal bulbocavernoso, sono visibili le ghiandole bulbouretrali (o ghiandole di Cowper), di forma arrotondata, situate alla base dei bulbi del pene e in posizione leggermente dorsale. Occorre procedere alla dissezione con grande cautela, per evitare di tagliare inavvertitamente la sottile capsula e provocare una fuoriuscita di fluido. Pesare la coppia di ghiandole bulbouretrali e annotare il peso, in mg arrotondato al primo decimale.
 - Riferire anche ogni eventuale fuoriuscita di fluido dalle ghiandole avvenuta durante l'autopsia e la dissezione.
55. Se la valutazione di una sostanza chimica richiede l'autopsia di un numero di animali superiore a quanto è ragionevole programmare per un solo giorno, l'inizio dello studio può essere ripartito su due giorni consecutivi, il che vale altrettanto per l'autopsia e le operazioni ad essa inerente. In questo tipo di programmazione, si deve utilizzare ogni giorno la metà degli animali per gruppo di trattamento.
56. Dopo l'autopsia, le carcasse devono essere smaltite in modo adeguato.

RELAZIONE

Dati

57. I dati, riassunti sotto forma di tabella, sono riferiti per individuo (ossia, peso corporeo, peso dei tessuti sessuali accessori, misurazioni facoltative e altre risposte e osservazioni) e per gruppo di animali (medie e deviazioni standard di tutte le misurazioni effettuate). I dati devono indicare il numero di animali all'inizio della prova, il numero degli animali trovati morti durante la prova o che hanno mostrato segni di tossicità, la descrizione dei segni di tossicità osservati, compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità.
58. La relazione finale deve contenere le seguenti informazioni.

Centro di saggio

- Nome del centro, ubicazione
- Direttore dello studio, altro personale e rispettive funzioni nello studio
- Date di inizio e fine dello studio, ossia, primo giorno di somministrazione della sostanza chimica in esame e ultimo giorno di autopsia

Sostanza chimica in esame

- Provenienza, numero di lotto/partita, identità, purezza, indirizzo completo del fornitore e caratterizzazione della sostanza chimica in esame
- Natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche
- Condizioni di stoccaggio, metodo e frequenza di preparazione delle diluizioni
- Qualsiasi dato ottenuto sulla stabilità
- Qualsiasi analisi delle soluzioni/sospensioni somministrate

Mezzo disperdente

- Caratterizzazione del mezzo disperdente (identità, fornitore e numero di lotto)
- Giustificazione della scelta del mezzo disperdente (se diverso dall'acqua)

Animali sperimentali e protocolli di allevamento

- Specie/ceppo utilizzato e giustificazione della loro scelta
- Provenienza o fornitore degli animali, con indirizzo completo
- Numero ed età degli animali forniti

- Condizioni di stabulazione (temperatura, illuminazione ecc.)
- Dieta (nome, tipo, fornitore, numero di lotto, composizione e, se noti, livelli di fitoestrogeni)
- Lettieria (nome, tipo, fornitore, composizione)
- Condizioni di stabulazione e numero di animali per gabbia

Condizioni sperimentali

- Età alla castrazione e durata dell'acclimatazione dopo la castrazione
- Peso di ciascun animale all'inizio della prova (espresso in grammi, arrotondato al primo decimale)
- Processo di randomizzazione e registro dell'assegnazione ai gruppi trattati con il mezzo disperdente, con la sostanza di riferimento e con la sostanza in esame, nonché registro dell'assegnazione alle gabbie
- MEDIA e deviazione standard del peso corporeo per ciascun gruppo per ogni giorno di pesata durante tutto lo studio
- Motivazione della scelta delle dosi
- Via di somministrazione della sostanza chimica in esame e motivazione della scelta della via di esposizione
- Se si tratta di un saggio sull'antiandrogenicità, il trattamento con TP (dose e volume)
- Trattamento con la sostanza chimica in esame (dose e volume)
- Momento della somministrazione delle dosi
- Protocolli di autopsia, comprese le procedure di dissanguamento ed eventuale anestesia
- Se si eseguono analisi del siero, dettagli del metodo. Per esempio, se si utilizza il dosaggio radioimmunologico (RIA), occorre riferire il protocollo RIA, la provenienza del kit RIA, la data di scadenza del kit, il protocollo per il conteggio in scintillazione e la standardizzazione.

Risultati

- Osservazioni giornaliere per ciascun animale durante la somministrazione della sostanza in esame, in particolare:
 - peso corporeo (in grammi, arrotondato al primo decimale),
 - eventuali segni clinici,
 - eventuali misurazioni o annotazioni sul consumo alimentare.
- Osservazioni autoptiche per ciascun animale, in particolare:
 - data dell'autopsia,
 - gruppo di trattamento dell'animale,
 - ID dell'animale,
 - dissettore,
 - giorno e ora dell'autopsia e della dissezione,
 - età dell'animale,
 - peso corporeo finale al momento dell'autopsia, segnalando eventuale aumento o calo ponderale statisticamente significativo,
 - ordine del dissanguamento e della dissezione degli animali al momento dell'autopsia,
 - peso dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti:
 - prostata ventrale (in mg, arrotondato al primo decimale),
 - vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, incluso il fluido (a coppia, in mg al primo decimale),
 - insieme del muscolo elevatore dell'ano e del muscolo bulbocavernoso (in mg, al primo decimale),
 - ghiandole bulbouretrali (a coppia, peso fresco in mg, al primo decimale),
 - ghiande (peso fresco in mg, al primo decimale),

- peso dei tessuti facoltativi, se determinato;
- fegato (in grammi, al primo decimale),
- rene (a coppia, in mg, al primo decimale),
- ghiandola surrenale (a coppia, in mg, al primo decimale),
- osservazioni generali.
- Analisi degli ormoni sieriche, se effettuate:
 - LH sierico (facoltativo — ng/ml di siero), e
 - T sierico (facoltativo — ng/ml di siero),
- commenti generali.

Sintesi dei dati

I dati sono riassunti sotto forma di tabelle contenenti le dimensioni del campione per ciascun gruppo, la media del valore e l'errore standard della media o la deviazione standard. Nelle tabelle figurano il peso corporeo al momento dell'autopsia, le variazioni del peso corporeo tra l'inizio della somministrazione fino all'autopsia, il peso dei tessuti sessuali bersaglio accessori e il peso degli eventuali organi facoltativi.

Discussione dei risultati

Analisi dei risultati

59. Il peso corporeo e il peso dei singoli organi in sede di autopsia sono oggetto di un'analisi statistica volta a determinare parametri quali l'omogeneità della varianza, mediante congrue trasformazioni dei dati, laddove necessario. I gruppi che hanno ricevuto il trattamento sono confrontati con un gruppo di controllo utilizzando tecniche quali l'analisi ANOVA seguita da confronti a coppie (ad esempio, il test di Dunnett ad una coda) e dall'applicazione di un criterio di differenza statistica, ad esempio, $p \leq 0,05$. Si individuano i gruppi che presentano una significatività statistica. Occorre tuttavia evitare i pesi di "organi relativi", dato che le ipotesi statistiche che sottendono a tale manipolazione dei dati non sono valide.
60. Per quanto concerne l'agonismo degli androgeni, il controllo è costituito dal gruppo sperimentale che riceve solo il mezzo disperdente. Le caratteristiche del modo di azione di una sostanza chimica possono provocare risposte relative diverse nei diversi tessuti, ad esempio il trenbolone, che non subisce l'azione della 5-alfa reduttasi, esercita effetti più pronunciati sul muscolo elevatore dell'ano, sul bulbo cavernoso e sul glande rispetto al TP. Un aumento ponderale statisticamente significativo ($p \leq 0,05$) di due o più dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti (prostata ventrale, muscolo elevatore dell'ano con bulbo cavernoso, glande, ghiandole bulbouretrali e vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione) può essere considerato un risultato positivo relativamente all'azione agonista androgenica, nel qual caso tutti i tessuti bersaglio devono presentare una certa accelerazione della crescita. La valutazione combinata di tutte le risposte dei tessuti degli organi sessuali accessori può essere realizzata tramite un'adeguata analisi multivariata dei dati. Questo metodo può servire per affinare l'analisi, in particolare nel caso in cui un solo tessuto fornisca una risposta statisticamente significativa.
61. Nello studio dell'antagonismo degli androgeni, il controllo è costituito dal gruppo cui è stato somministrato l'androgeno di riferimento (solo il testosterone propionato). Le caratteristiche del modo di azione di una sostanza chimica possono provocare risposte relative diverse nei diversi tessuti, ad esempio gli inibitori della 5-alfa reduttasi, come la finasteride, hanno effetti più marcati nella prostata ventrale che negli altri tessuti, rispetto a un potente antagonista di recettori per gli androgeni, come il flutamide. Una diminuzione ponderale statisticamente significativa ($p \leq 0,05$) di due o più dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti (prostata ventrale, muscolo elevatore dell'ano con bulbo cavernoso, glande, ghiandole bulbouretrali e vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione), rispetto al trattamento con solo TP, deve essere considerata un risultato positivo relativamente all'azione antagonista androgenica, nel qual caso tutti i tessuti bersaglio devono presentare un certo rallentamento della crescita. La valutazione combinata di tutte le risposte dei tessuti degli organi sessuali accessori può essere realizzata tramite un'adeguata analisi multivariata dei dati. Questo metodo può servire per affinare l'analisi, in particolare nel caso in cui un solo tessuto fornisca una risposta statisticamente significativa.
62. I dati sono riassunti sotto forma di tabelle contenenti la media, l'errore standard della media (è ammessa anche la deviazione standard) e le dimensioni del campione per ciascun gruppo. Devono essere incluse anche tabelle con i dati individuali. Occorre esaminare i valori individuali, la media, l'errore standard (deviazione standard) e i valori del CV dei risultati del controllo per determinare se rispettano i criteri accettabili di coerenza con i valori storici previsti. Se i valori del CV sono superiori a quelli che figurano nella tabella 1 (cfr. paragrafi 25 e 26), occorre determinare, per ciascun peso di organo, se vi sono errori nella registrazione o nella trascrizione dei dati oppure se il laboratorio non è ancora in grado di condurre correttamente la dissezione dei tessuti androgeno-dipendenti e

necessita di ulteriore formazione/pratica. Generalmente, i CV (deviazione standard divisa per il peso medio degli organi) sono riproducibili da un laboratorio all'altro e da uno studio all'altro. I dati presentati devono includere almeno il peso della prostata ventrale, della vescicola seminale, del muscolo elevatore dell'ano con il bulbocavernoso, delle ghiandole bulbouretrali, del glande, del fegato e il peso corporeo, nonché la variazione di quest'ultimo tra l'inizio della somministrazione fino all'autopsia. I dati possono anche essere presentati dopo una correzione di covarianza in funzione del peso corporeo, ma ciò non dispensa dal presentare i dati non corretti. Inoltre, se in qualche gruppo non si osserva la separazione prepuziale, occorre registrare l'incidenza di questo dato e confrontarla statisticamente con il gruppo di controllo utilizzando un test di Fisher esatto.

63. Al momento di verificare la concordanza tra i risultati immessi nel computer e quelli sui fogli di lavoro originali, i valori ponderali degli organi che non sono biologicamente plausibili o che si scostano di oltre tre deviazioni standard rispetto a quelli del gruppo trattato vanno esaminati con molta attenzione ed eventualmente scartati, se si stabilisce che sono probabili errori di registrazione.
 64. Il confronto dei risultati dello studio con i valori del CV dell'OCSE (tabella 1) è spesso una tappa importante dell'interpretazione, che serve a soppesare la validità dei risultati dello studio. Il laboratorio deve conservare i dati storici riguardanti i gruppi di controllo trattati con il mezzo disperdente, così come i dati storici sugli effetti delle sostanze chimiche di riferimento positive, come il TP e l'FT. Il laboratorio può inoltre saggiare periodicamente la risposta ad agonisti e antagonisti degli androgeni noti per la debole azione, e conservare i relativi dati. Questi dati possono essere confrontati con i dati OCSE disponibili per garantire che i metodi del laboratorio presentino una precisione e una potenza statistiche sufficienti.
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

Androgenico: indicante un influsso positivo sulla crescita dei tessuti androgeno-dipendenti.

Antiandrogenico: indicante la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività del testosterone propionato nei mammiferi.

Data di nascita: giorno 0 dopo la nascita.

Dosaggio: termine generale che ricomprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Dose: quantità di sostanza chimica somministrata. Nel saggio di Hershberger, la dose è espressa come peso della sostanza in esame per unità di peso corporeo dell'animale sperimentale per giorno (ad esempio, mg/kg peso corporeo/giorno).

Giorno postnatale X: giorno X di vita dopo il giorno di nascita.

Moribondo: termine utilizzato per descrivere un animale agonizzante, ossia prossimo alla morte.

Sensibilità: capacità di un metodo di prova di individuare correttamente le sostanze chimiche aventi la proprietà per la quale sono esaminate.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Specificità: capacità di un metodo di prova di individuare correttamente le sostanze chimiche non aventi la proprietà per la quale sono esaminate.

Validazione: processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un fine specifico.

Appendice 2

Nota: documento preparato dal Segretariato del Programma sulle linee guida, a partire dall'accordo raggiunto alla VI riunione del gruppo di studio sulla sperimentazione e sulla valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (*EDTA Task Force*)

Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino

Livello 1 Selezione e prioritizzazione sulla base delle informazioni disponibili	— proprietà fisiche e chimiche, es. peso molecolare, reattività, volatilità, biodegradabilità, — esposizione degli esseri umani e dell'ambiente, es. volume di produzione, rilascio, modi d'uso — pericoli, es. dati tossicologici disponibili
Livello 2 Saggi <i>in vitro</i> che forniscono dati meccanicistici	— affinità del legame ai recettori degli estrogeni, degli androgeni e degli ormoni tiroidei — attivazione della trascrizione — aromatasi e steroidogenesi <i>in vitro</i> — riconoscimento/fissazione sul recettore degli idrocarburi aromatici — relazioni quantitative struttura-attività (QSARs) — screening preliminari ad alto rendimento — funzione tiroidea — saggio sulla vitellogenina degli epatociti dei pesci — altri (se del caso)
Livello 3 Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a un singolo meccanismo ed effetto endocrino	— saggio uterotropico(estrogeni) — saggio di Hershberger (androgeni) — funzione ormononale non mediata da recettori — altre funzioni (es. tiroidea) — saggio sulla vitellogenina degli epatociti dei pesci (estrogeni)
Livello 4 Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a diversi meccanismi ed effetti endocrini	— LG OCSE n. 407 migliorata (endpoint basati su meccanismi endocrini) — saggi sulla pubertà su maschi e femmine — saggio sul maschio adulto intatto — saggio istopatologico sulle gonadi dei pesci — saggio sulla metamorfosi delle rane
Livello 5 Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a meccanismi endocrini e altri meccanismi	— saggio su una generazione (LG n. 415 migliorata)¹ — saggio su due generazioni (LG n. 416 migliorata)¹ — prova di screening per la riproduzione (LG n. 421 migliorata)¹ — studio combinato sulla tossicità a dosi ripetute e di screening della tossicità per la riproduzione e sullo sviluppo (linea guida OCSE n. 422 migliorata)¹ ¹ gli eventuali miglioramenti saranno esaminati dal gruppo di gestione e validazione dei saggi sui mammiferi (VMG mammals) — saggio svolto su una parte o sulla totalità del ciclo di vita di pesci, uccelli, anfibi e invertebrati (sviluppo e riproduzione)

VMG mammals: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment (gruppo di gestione della validazione per la sperimentazione e la valutazione dei mammiferi)

NOTE RELATIVE AL QUADRO CONCETTUALE

- Nota 1:* è possibile aderire al quadro e discostarsene a partire da qualsiasi livello, in base alla natura delle informazioni necessarie ai fini della valutazione dei rischi e dei pericoli.
- Nota 2:* nel livello 5, l'analisi ecotossicologica deve includere endpoint che mettano in evidenza i meccanismi degli effetti negativi, nonché i potenziali danni per la popolazione.
- Nota 3:* se un modello multimodale comprende diversi metodi di prova che forniscono dati su un solo endpoint, tale modello deve sostituire i singoli metodi.
- Nota 4:* ogni sostanza chimica deve essere valutata caso per caso, alla luce di tutte le informazioni disponibili e tenendo presente la funzione dei livelli del quadro.
- Nota 5:* la versione attuale del quadro non va considerata esaustiva. Tra le prove che figurano nei livelli 3, 4 e 5, alcune sono già disponibili, altre devono ancora essere convalidate e vi sono incluse provvisoriamente. Saranno confermate una volta messe a punto e convalidate.
- Nota 6:* il livello 5 non si limita a contenere solo metodi di prova definitivi. Le prove che vi figurano servono ai fini della valutazione generale dei rischi e dei pericoli.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1998). Reports of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.
- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J*26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J*26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.

- (14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York: Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.
- (17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. Cfr. section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html
- (23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- (25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.
- (26) Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (GU L 276 del 20.10.2010, pag. 33).
- (27) I seguenti capitoli del presente allegato:
 - B.1 bis, Tossicità acuta orale — Metodo a dose fissa
 - B.1 ter, Tossicità acuta per via orale — Metodo della classe di tossicità acuta

B.56 STUDIO ESTESO DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE SU UNA GENERAZIONE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 443 (2012). Si basa sulla proposta di uno studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione F_1 in varie fasi di vita formulata dal comitato tecnico ACSA (Agricultural Chemical Safety Assessment) — parte dell'-HESI (Environmental Sciences Institute), a sua volta parte dell'ILSI (International Life Science Institute) — e che è stata pubblicata in Cooper *et al.*, 2006 (1). L'impostazione dello studio è stata migliorata e resa più chiara in diversi punti per consentire flessibilità e sottolineare l'importanza di partire dalle conoscenze esistenti, integrandole poi con le osservazioni condotte nel corso dello studio per orientare e calibrare la prova. Questo metodo di prova fornisce una descrizione particolareggiata delle procedure operative dello studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione. Il metodo di prova descrive tre coorti di animali di generazione F_1 :

coorte 1: per la valutazione degli endpoint in materia di riproduzione/sviluppo; la coorte può in seguito includere animali di generazione F_2 ;

coorte 2: per la valutazione dell'impatto potenziale dell'esposizione ai prodotti chimici sullo sviluppo del sistema nervoso;

coorte 3: per la valutazione dell'impatto potenziale dell'esposizione ai prodotti chimici sullo sviluppo del sistema immunitario.

2. Le decisioni sull'opportunità di valutare la seconda generazione e di omettere le coorti necessarie a determinare la neurotossicità e/o l'immunotossicità nella fase dello sviluppo vanno prese sia sulla base delle conoscenze esistenti riguardo alla sostanza chimica in esame, sia dei requisiti stabiliti dalle diverse autorità di regolamentazione. L'obiettivo del presente metodo di prova è fornire informazioni dettagliate su come condurre lo studio e valutare ciascuna coorte.
3. La procedura riguardo alla decisione di valutare una seconda generazione, presa a partire da parametri interni, è descritta nel documento di orientamento dell'OCSE n. 117 (39), destinato alle autorità di regolamentazione che si servono di tali parametri.

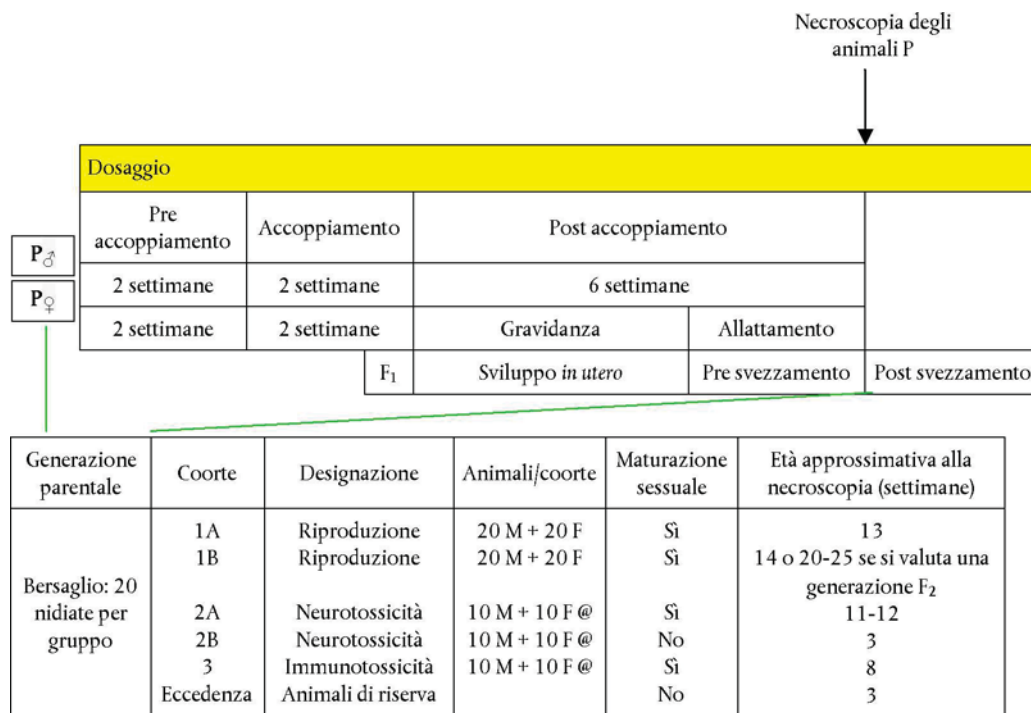
CONSIDERAZIONI INIZIALI E OBIETTIVI

4. Lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione ha come obiettivo principale la valutazione di determinate fasi di vita non coperte da altri tipi di studi della tossicità, nonché degli effetti che possono verificarsi a seguito di un'esposizione pre- e postnatale a una sostanza chimica. Per gli endpoint riproduttivi si prevede di ricorrere inizialmente, se disponibili, alle informazioni derivanti da studi con somministrazione ripetuta della dose [incluso gli studi sulla tossicità per la riproduzione, ad esempio la linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 422 (32)], o da prove di screening a breve termine degli interferenti endocrini [ad esempio, saggio uterotropico — metodo di prova B.54 (36); e saggio di Hershberger — metodo di prova B.55 (37)], per rilevare gli effetti sugli organi riproduttivi maschili e femminili. Per i maschi, ciò può includere la spermatogenesi (istopatologia dei testicoli), mentre per le femmine si ricorre ai cicli estrali, al conteggio dei follicoli/maturazione degli ovociti e all'integrità ovarica (istopatologia). Lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione serve quindi anche come prova per gli endpoint riproduttivi che richiedono l'interazione tra maschi e femmine, tra femmine e feti, nonché tra femmine, discendenti e la generazione F_1 fin dopo la maturità sessuale [cfr. documento di orientamento dell'OCSE n. 151, che sostiene il presente metodo di prova (40)].
5. Il metodo di prova è destinato a fornire una valutazione degli effetti pre- e postnatali delle sostanze chimiche sullo sviluppo, oltre a una valutazione attenta della tossicità sistemica presso le femmine gravide o che allattano e la progenie giovane e adulta. L'esame dettagliato degli endpoint fondamentali dello sviluppo (quali sopravvivenza della progenie, salute neonatale, livello di sviluppo alla nascita, nonché sviluppo fisico e funzionale fino all'età adulta) dovrebbe individuare specifici organi bersaglio nella progenie. Inoltre, lo studio fornirà e/o confermerà informazioni sugli effetti della sostanza chimica in esame sull'integrità e sulle prestazioni degli apparati riproduttori maschili e femminili negli animali adulti. Vengono presi in considerazione in modo specifico, sebbene non esclusivo, i seguenti parametri: funzionalità delle gonadi, ciclo estrale, maturazione dello sperma epididimiale, comportamento in fase di accoppiamento, concepimento, gravidanza, parto e allattamento. Inoltre, le informazioni ottenute dalla valutazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo e della immunotossicità nella fase dello sviluppo caratterizzeranno gli effetti potenziali su tali sistemi. I dati ottenuti dalle prove dovrebbero permettere di determinare i NOAEL (*no observed adverse effect level*, il più alto livello di dose in cui non si osserva un effetto), i LOAEL (*lowest observed adverse effect level*, il più basso livello di dose in cui si osserva un effetto), e/o le dosi di riferimento per i vari endpoint, e/o servire a caratterizzare gli effetti rilevati nei precedenti studi con somministrazione ripetuta, e/o fungere da guida per le prove successive.
6. Il protocollo è illustrato schematicamente nella figura 1. La sostanza chimica in esame viene somministrata continuamente in dosi scalari a diversi gruppi di maschi e femmine sessualmente maturi. A questa generazione parentale (P) si somministra la sostanza per un determinato periodo precedente l'accoppiamento (stabilito sulla base delle informazioni disponibili per la sostanza chimica in esame, ma comunque non inferiore a due settimane) e durante le due settimane di accoppiamento. I maschi P sono trattati più a lungo, almeno fino allo svezzamento della generazione F_1 ; dovrebbero essere trattati per un minimo di 10 settimane, ma possono essere trattati più a lungo se è necessario chiarire gli effetti sulla riproduzione. Il trattamento delle femmine P continua durante la gravidanza e l'allattamento, fino alla loro soppressione, dopo lo svezzamento della prole (vale a dire 8-10 settimane di trattamento). La progenie F_1 continua a ricevere la sostanza chimica in esame dallo svezzamento all'età adulta. Nel caso venga valutata una seconda generazione [cfr. documento di orientamento dell'OCSE n. 117 (39)], la progenie F_1 continua a ricevere il trattamento fino allo svezzamento della generazione F_2 , o fino al termine dello studio.
7. Tutti gli animali vanno sottoposti a osservazione clinica e patologica per individuare eventuali segni di tossicità, in particolare eventuali effetti sull'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori maschili e femminili nonché sulla salute, crescita, sviluppo e funzione della progenie. Allo svezzamento, parte della progenie viene raggruppata in sottogruppi specifici (coorti da 1 a 3, cfr. i paragrafi 33 e 34 e la figura 1) per ulteriori valutazioni, in particolare riguardo alla maturazione sessuale, l'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori, gli endpoint neurologici e comportamentali e le funzioni immunitarie.
8. Durante lo svolgimento dello studio è opportuno seguire i principi guida e le considerazioni di cui al documento di orientamento dell'OCSE n. 19, *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (34).

9. Quando il numero di studi a disposizione consentirà di verificare l'impatto della nuova impostazione qui presentata, il metodo di prova sarà riesaminato e, se necessario, rivisto alla luce dell'esperienza acquisita.

Figura 1

Schema dello studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione



@ uno per nidiata e rappresentativo di 20 nidiata in totale laddove possibile

DESCRIZIONE DEL METODO/PREPARATIVI PER LA PROVA

Animali

Selezione della specie e del ceppo

10. La scelta della specie per la prova sulla tossicità per la riproduzione deve essere attentamente considerata alla luce di tutte le informazioni disponibili. Tuttavia, vista l'abbondanza di dati di controllo e la comparabilità con le prove generali sulla tossicità, il ratto è generalmente la specie preferita e i criteri e le raccomandazioni avanzate nel presente metodo di prova si riferiscono a tale specie. In caso di utilizzo di una specie diversa, occorre giustificare tale scelta e apportare adeguate modifiche al protocollo. Non vanno usati ceppi a bassa fecondità o con un'elevata incidenza nota di difetti spontanei dello sviluppo.

Età, peso corporeo e criteri di inclusione

11. Occorre utilizzare animali genitori sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Lo studio include animali maschi e femmine; queste ultime saranno nullipare e non gravide. Gli animali P saranno sessualmente maturi, di peso simile (per uno stesso sesso) a inizio trattamento, di età simile (circa 90 giorni) al momento dell'accoppiamento, e rappresentativi della specie e del ceppo oggetto dello studio. Dopo l'arrivo, gli animali vanno acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni. Gli animali vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento, in modo che il peso corporeo medio dei gruppi sia comparabile (vale a dire $\pm 20\%$ rispetto al valore medio).

Condizioni di stabulazione e alimentazione

12. La temperatura dello stabulario deve essere di $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). L'umidità relativa è mantenuta tra il 30 e il 70 %, con un intervallo ideale tra il 50 e il 60 %. L'illuminazione artificiale ha un fotoperiodo 12:12 (luce/buio). Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata

d'acqua da bere. Occorre prestare particolare attenzione al tenore di fitoestrogeni nella dieta, in quanto la loro presenza a livelli elevati potrebbe incidere su alcuni endpoint riproduttivi. Sono raccomandati regimi alimentari standard a formula aperta, a tenore ridotto di sostanze chimiche estrogene (2)(30). La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se quest'ultima è somministrata con il cibo. Occorre verificare il tenore, l'omogeneità e la stabilità della sostanza in esame nelle diete. L'alimentazione e l'acqua da bere vengono analizzate periodicamente per verificare la presenza di contaminanti. Campioni di ciascun lotto della dieta utilizzata nel corso dello studio sono conservati in condizioni adeguate (ad esempio congelati a -20°C) fino all'avvenuta stesura della relazione, qualora i risultati richiedano un'ulteriore analisi degli ingredienti della dieta.

13. Gli animali vanno alloggiati in gabbie, in piccoli gruppi dello stesso sesso e gruppo di trattamento; è possibile alloggiarli individualmente per evitare che si feriscano (ad esempio, nel caso di maschi dopo il periodo di accoppiamento). Le procedure di accoppiamento si svolgono in gabbie adeguate allo scopo. Dopo comprovata copulazione, le femmine che si presume siano gravide vanno alloggiare separatamente, in gabbie apposite per il parto o la maternità dotate di adeguati e specifici materiali per la preparazione del nido. La prole è alloggiata con la rispettiva madre fino allo svezzamento. Gli animali F_1 sono alloggiati in piccoli gruppi, dello stesso sesso e gruppo di trattamento, dallo svezzamento alla soppressione. Se ciò è giustificato da un punto di vista scientifico, gli animali possono essere alloggiati individualmente. Il livello di fitoestrogeni contenuti nel materiale scelto per le lettiere deve essere minimo.

Numero e identificazione degli animali

14. Ogni gruppo di trattamento e di controllo comprende un numero sufficiente di coppie in cui è avvenuta la copulazione da poter fornire circa 20 femmine incinte per ogni gruppo-dose. Lo scopo è ottenere un numero di gravidanze che consenta una valutazione significativa del potenziale della sostanza in esame di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza e sul comportamento materno degli animali della generazione P, nonché sulla crescita e sullo sviluppo della progenie F_1 , dal concepimento alla maturità. Se non si ottiene un numero sufficiente di femmine gravide lo studio non è necessariamente invalidato; le circostanze vanno valutate caso per caso, considerando eventualmente la presenza di un nesso causale con la sostanza in esame.
15. Ad ogni animale P viene assegnato un numero identificativo unico prima della somministrazione delle dosi. Se dati di laboratorio precedenti indicano che una notevole proporzione delle femmine non presenta regolari cicli estrali (4 o 5 giorni), si raccomanda di procedere a una valutazione dei cicli estrali prima di iniziare il trattamento. In alternativa, è possibile creare un gruppo più grande così da assicurare che contenga almeno 20 femmine con cicli estrali regolari (4 o 5 giorni) all'inizio del trattamento. Tutta la progenie F_1 viene identificata in modo inequivocabile quando i neonati sono esaminati per la prima volta, il giorno 0 o 1 dopo la nascita (PND 0 o 1). Le registrazioni che indicano la nidiata di origine sono conservate per tutti gli animali F_1 , e F_2 , se del caso, per tutta la durata dello studio.

Sostanza chimica in esame

Informazioni sulla sostanza chimica in esame

16. La rassegna delle informazioni esistenti è importante in vista delle decisioni riguardanti la via di somministrazione, la scelta del mezzo disperdente, la scelta della specie animale, la selezione delle dosi ed eventuali modifiche del calendario di somministrazione. Pertanto, nella pianificazione dello studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione vanno prese in considerazione tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, cioè: informazioni fisico-chimiche, tossicocinetica (compreso metabolismo specifico alla specie), proprietà tossicodinamiche, rapporti struttura-attività (SAR), processi metabolici in vitro, risultati di precedenti studi di tossicità e informazioni pertinenti sugli analoghi strutturali. Informazioni preliminari sull'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione (ADME) e sulla bioaccumulazione possono essere derivate dalla struttura chimica, dai dati fisico-chimici, dalla capacità di fissazione delle proteine plasmatiche o da studi tossicocinetici, mentre i risultati degli studi di tossicità forniscono ulteriori informazioni, ad esempio sul NOAEL, sul metabolismo o sull'induzione del metabolismo.

Dati tossicocinetici

17. Sebbene non sia richiesto, i dati tossicocinetici provenienti da precedenti prove di definizione del range delle dosi o da altri studi sono estremamente utili al fine di pianificare l'impostazione dello studio, la selezione dei livelli di dose e l'interpretazione dei risultati. Sono di particolare utilità i dati che: 1) verificano l'esposizione dei feti in via di sviluppo e dei piccoli alla sostanza in esame (o ai relativi metaboliti); 2) forniscono una stima della dosimetria interna; e 3) valutano la saturazione potenziale, dipendente dalla dose, dei processi cinetici. Se disponibili, occorre

tenere in considerazione anche ulteriori dati tossicocinetici quali i profili dei metaboliti, i decorsi temporali delle concentrazioni ecc.. Dati tossicocinetici supplementari possono essere rilevati anche durante lo studio principale, purché questo non interferisca con la raccolta e l'interpretazione dei principali endpoint pertinenti a tale studio.

A titolo orientativo, per pianificare uno studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione sono utili i seguenti dati tossicocinetici:

- a fine gravidanza (es. ventesimo giorno di gestazione) — sangue materno e fetale,
- a metà dell'allattamento (PND 10) — sangue materno, sangue del piccolo e/o latte,
- poco dopo lo svezzamento (es. PND 28) — campioni di sangue dei piccoli svezzati.

Sarà necessaria una certa flessibilità nella scelta degli analiti specifici (ad esempio composto progenitore e/o metaboliti) e del programma di campionamento. Ad esempio, quante volte procedere al campionamento e quando farlo in un determinato giorno dipenderà dalla via di esposizione e dalla previa conoscenza delle proprietà tossicocinetiche negli animali non gravidi. Per gli studi che prevedono somministrazione nella dieta, è sufficiente un singolo campionamento alla medesima ora per ciascuno dei giorni prestabiliti selezionati, mentre per gli studi che prevedono una somministrazione tramite sonda gastrica può essere necessario prevedere ulteriori campionamenti onde ottenere una migliore stima del range di dosi interne. Tuttavia, non è necessario tracciare l'integralità della funzione concentrazione-tempo per ogni giorno di campionamento. Se necessario, i prelievi di sangue da feti e neonati di una medesima nidiata destinati ad essere analizzati possono essere raggruppati per sesso.

Via di somministrazione

18. Per scegliere la via di somministrazione occorre tenere conto delle vie più rilevanti per l'esposizione umana. Sebbene il protocollo preveda la somministrazione della sostanza chimica di prova attraverso la dieta, è consentito modificarlo per utilizzare altre vie (acqua da bere, sonda gastrica, inalazione, via cutanea), a seconda delle caratteristiche del prodotto chimico e delle informazioni richieste.

Scelta del mezzo disperdente

19. Ove necessario, la sostanza in esame è disciolta o sospesa in un mezzo disperdente adeguato. Si raccomanda di prendere in considerazione, in primis e ogniqualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta l'uso di una soluzione/sospensione in olio (ad esempio olio di semi di mais). Devono essere note le caratteristiche tossiche dei mezzi disperdenti diversi dall'acqua. Va evitato l'uso di mezzi disperdenti con potenziale tossicità intrinseca (quali acetone, DMSO). È necessario determinare la stabilità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente. In caso venga utilizzato un mezzo disperdente o un altro additivo per facilitare il dosaggio, occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza in esame; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza in esame che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sul consumo di cibo o di acqua o sullo stato nutrizionale degli animali.

Scelta delle dosi

20. Di norma, lo studio deve comprendere almeno tre livelli di dose e un gruppo di controllo parallelo. Nel selezionare livelli adeguati di dose, il ricercatore considera tutte le informazioni disponibili, comprese le informazioni sulla somministrazione provenienti da studi precedenti, i dati tossicocinetici relativi ad animali gravidi o non gravidi, la portata dell'esposizione alla sostanza attraverso l'allattamento e la stima dell'esposizione umana. Se sono disponibili dati tossicocinetici che indicano una saturazione dei processi tossicocinetici legata alla dose, occorre evitare i livelli di dose alti che comportano inevitabilmente saturazione, purché, naturalmente, si preveda che l'esposizione umana sia nettamente inferiore a questo punto di saturazione. In casi simili, il livello di dose più elevato corrisponde o si situa appena al di sopra del punto di flesso verso un comportamento tossicocinetico non lineare.
21. In assenza di dati tossicocinetici pertinenti, i livelli di dose si basano sugli effetti tossici, a meno che non vi siano limiti imposti dalla natura fisico/chimica della sostanza chimica in esame. Se i livelli di dose sono basati sulla tossicità, la dose più elevata va scelta con l'obiettivo di indurre una qualche tossicità sistemica, ma non tale da provocare né il decesso né gravi sofferenze negli animali.
22. Occorre selezionare dosi scalari decrescenti al fine di evidenziare eventuali relazioni dose-effetto e di stabilire i NOAEL o le dosi prossime al limite di rivelabilità che consentirebbero di derivare una dose di riferimento per l'endpoint o gli endpoint più sensibili. Per evitare intervalli importanti tra le dosi per NOAEL e LOAEL, il ricorso a multipli di due o di quattro è generalmente ottimale. L'aggiunta di un quarto gruppo di prova è spesso preferibile all'uso di un intervallo ampio tra le dosi (ad esempio, di un fattore di oltre il 10).

23. Gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali, salvo per il trattamento con la sostanza in esame. Il gruppo di controllo non deve essere trattato, oppure va trattato con un placebo, oppure, qualora si utilizzi un mezzo disperdente per somministrare la sostanza in esame, va trattato col solo mezzo disperdente. Se si utilizza un mezzo disperdente, il gruppo di controllo riceverà il mezzo disperdente al volume più elevato in uso nella prova.

Prova limite

24. Se negli studi con somministrazione ripetuta non appaiono segni di tossicità con un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, oppure se non si prevede tossicità sulla base dei dati relativi a sostanze con una struttura e/o un'azione metabolica analoghe e con proprietà metaboliche in vivo/in vitrosimili, potrebbe non essere necessario procedere a uno studio che utilizza diversi livelli di dose. In casi simili, lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione può limitarsi a un gruppo di controllo e a una dose unica di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno. Tuttavia, qualora si rilevasse che questa dose limite provoca segni di tossicità per la riproduzione o lo sviluppo, sarà necessario svolgere ulteriori studi a dosi inferiori per determinare il NOAEL. Queste considerazioni sulla prova limite si applicano soltanto nel caso in cui il livello di esposizione umana non implica la necessità di valutare un livello di dose più elevato.

PROTOCOLLI

Esposizione della progenie

25. La somministrazione tramite l'alimentazione è il metodo di esposizione da privilegiare. Negli studi che ricorrono a sonda gastrica occorre notare che, normalmente, i piccoli ricevono la sostanza in esame indirettamente, attraverso il latte materno, finché non comincia la somministrazione diretta al momento dello svezzamento. Negli studi che prevedono la somministrazione nella dieta o nell'acqua da bere, i piccoli ricevono la sostanza anche direttamente a partire da quando cominciano ad alimentarsi da soli, durante l'ultima settimana del periodo di allattamento. L'impostazione dello studio viene modificata se vi è scarsa escrezione della sostanza chimica di prova nel latte e se non è comprovata l'esposizione continua della progenie. In questi casi, si provvederà a esporre direttamente i piccoli durante l'allattamento in funzione dei dati tossicocinetici disponibili, della tossicità per la progenie o di cambiamenti nei biomarcatori (3) (4). Prima di avviarli, occorre considerare con attenzione i vantaggi e gli svantaggi di condurre studi che prevedono la somministrazione diretta a piccoli in fase di allattamento (5).

Programma di dosaggio e somministrazione delle dosi

26. Potrebbero essere disponibili alcune informazioni, provenienti da precedenti studi di tossicità a dose ripetuta di durata adeguata, riguardo a cicli estrali, istopatologia degli apparati riproduttori maschili e femminili, e analisi dello sperma testicolare/epididimiale. Per quanto riguarda lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione, la durata del trattamento prima dell'accoppiamento deve quindi permettere di individuare gli effetti sui mutamenti funzionali che possono interferire con il comportamento in fase di accoppiamento e con la fecondazione. Il trattamento prima dell'accoppiamento deve essere sufficientemente lungo da consentire di raggiungere condizioni stazionarie di esposizione nei maschi e nelle femmine P. Nella maggior parte dei casi un trattamento di due settimane prima dell'accoppiamento è ritenuto adeguato. Per le femmine questo periodo corrisponde a 3 o 4 cicli estrali completi e dovrebbe essere sufficiente a individuare eventuali effetti avversi sulla ciclicità. Per i maschi, il periodo corrisponde al tempo necessario per il transito epididimiale degli spermatozoi in fase di maturazione e deve consentire di rilevare effetti post-testicolari sullo sperma (durante le fasi finali della spermiogenesi e della maturazione dello sperma epididimiale) in fase di accoppiamento. Al momento della soppressione, quando si deve procedere all'istopatologia testicolare ed epididimiale e all'analisi dei parametri dello sperma, i maschi P e F₁ saranno stati esposti per almeno un intero ciclo spermatogenico [(6) (7) (8) (9) e documento di orientamento OCSE n. 151 (40)].
27. Gli scenari di esposizione dei maschi prima dell'accoppiamento possono essere adattati nel caso in cui studi precedenti abbiano messo chiaramente in rilievo una tossicità testicolare (anomalie della spermatogenesi) o degli effetti sull'integrità e funzionalità dello sperma. Analogamente, anche per le femmine la presenza di effetti noti della sostanza in esame sul ciclo estrale e quindi sulla recettività sessuale può giustificare la modifica degli scenari di esposizione prima dell'accoppiamento. In casi particolari può essere accettabile che il trattamento delle femmine P sia avviato solo dopo aver individuato sperma tramite uno striscio vaginale [cfr. documento di orientamento OCSE n. 151 (40)].
28. Una volta stabilita la durata del periodo di esposizione prima dell'accoppiamento, gli animali vengono trattati con la sostanza chimica in esame in continuo, 7 giorni su 7, fino all'autopsia. Tutti gli animali vanno esposti alla sostanza con lo stesso metodo. La somministrazione continua durante il periodo di accoppiamento, della durata di 2 settimane; per le femmine P deve continuare per tutta la gestazione e l'allattamento, fino al giorno della loro soppressione dopo lo svezzamento. I maschi sono trattati in modo identico fino alla loro soppressione, al momento dello svezzamento degli animali F₁. Per l'autopsia, la priorità va alle femmine, che devono essere sottoposte ad autopsia lo stesso giorno di lattazione o un giorno simile. L'autopsia dei maschi può essere scaglionata

su più giorni in funzione delle attrezzature disponibili in laboratorio. Se non è già stato avviato durante il periodo di lattazione, la somministrazione diretta della sostanza a maschi e femmine F_1 selezionati avrà inizio allo svezzamento e continuerà fino alla prevista autopsia, a seconda della coorte a cui sono stati assegnati.

29. Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua da bere è importante impedire che la quantità della sostanza in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dose costante in funzione del peso corporeo di ciascun animale, avendo cura di specificare quale sia l'alternativa prescelta.
30. Se la sostanza in esame viene somministrata tramite sonda gastrica, il volume del liquido da somministrare in una sola volta non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo (0,4 ml/100 g di peso corporeo è il massimo per l'olio, es. olio di semi di mais). Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato va ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose. Il trattamento è somministrato ogni giorno all'incirca alla stessa ora. La dose per ciascun animale si basa normalmente sulla pesata più recente dell'animale e va regolata almeno una volta alla settimana per i maschi adulti e le femmine adulte non gravide, e ogni due giorni per le femmine gravide e gli animali F_1 in caso sia somministrata prima dello svezzamento e durante le 2 settimane dopo lo svezzamento. Se i dati tossicocinetici indicano un trasferimento di lieve entità della sostanza chimica in esame nella placenta, potrebbe essere necessario modificare la dose somministrata mediante sonda gastrica nel corso dell'ultima settimana di gravidanza per impedire l'assunzione di una dose eccessivamente tossica nella madre. Il giorno del parto le femmine non vanno trattate né con sonda gastrica né per altre vie di trattamento che prevedono la manipolazione dell'animale; quel giorno è addirittura preferibile non somministrare la sostanza in esame piuttosto che rischiare di turbare il parto.

Accoppiamento

31. Ogni femmina P viene posta in contatto con un singolo maschio, selezionato casualmente, non imparentato e dello stesso gruppo-dose (coppie 1:1), fino a quando la copulazione è comprovata o sono trascorse 2 settimane. Se i maschi sono insufficienti, ad esempio a causa di mortalità maschile prima della formazione di coppie, si può ricorrere a un maschio che si sia già accoppiato e appaiarlo (1:1) a una seconda femmina, in modo che tutte le femmine possano accoppiarsi. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si riscontra la prova dell'avvenuta copulazione (presenza di un tappo vaginale o di sperma). Gli animali vanno separati non appena possibile dopo aver osservato una prova della copulazione. Se l'accoppiamento non ha avuto luogo dopo 2 settimane, gli animali vengono separati senza ulteriore opportunità per l'accoppiamento. Le coppie vanno identificate chiaramente in sede di registrazione dei dati.

Dimensioni della nidiata

32. Il quarto giorno dopo la nascita è possibile uniformare la dimensione di ogni nidiata eliminando i piccoli in eccesso tramite selezione casuale, in modo da ottenere, nella misura del possibile, cinque maschi e cinque femmine per nidiata. L'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio in base al peso corporeo, non è appropriata. Ogni volta che il numero di maschi o di femmine non permette di avere cinque animali di ciascun sesso per nidiata, è accettabile una regolazione parziale (ad esempio, sei maschi e quattro femmine).

Selezione dei piccoli per studi dopo lo svezzamento (cfr. figura 1)

33. Allo svezzamento (intorno al PND 21) vengono selezionati da tutte le nidiata disponibili fino a un massimo di 20 piccoli per gruppo-dose e gruppo di controllo, che verranno sottomessi a ulteriori esami e allevati fino a raggiunta maturazione sessuale (a meno che siano necessarie prove precedenti). La selezione è casuale, con l'eccezione degli esemplari più piccoli (animali con un peso corporeo al di sotto di oltre due deviazioni standard della media dei piccoli delle rispettive nidiata) che non vanno inclusi poiché è improbabile che siano rappresentativi del gruppo di trattamento.

Al PND 21, i piccoli F_1 selezionati vengono assegnati in modo casuale a una delle tre coorti di animali, nel modo seguente:

coorte 1 (1A e 1B) = prove di tossicità per la riproduzione/nella fase dello sviluppo

coorte 2 (2A e 2B) = prove di neurotossicità nella fase dello sviluppo

coorte 3 = prove di immunotossicità nella fase dello sviluppo

Coorte 1A: un maschio e una femmina/nidiata/gruppo (20/sexo/gruppo): selezione prioritaria per la valutazione primaria degli effetti sull'apparato riproduttivo e della tossicità generale.

Coorte 1B: un maschio e una femmina/nidiata/gruppo (20/sexo/gruppo): selezione prioritaria per una valutazione ulteriore della capacità riproduttiva attraverso l'accoppiamento di animali F_1 , se del caso [cfr. documento di orientamento OCSE n. 117 (39)], e per ottenere ulteriori informazioni istopatologiche nel caso di agenti sospettati di essere tossici per la riproduzione o per il sistema endocrino, oppure nel caso i risultati della coorte 1A siano ambigui.

Coorte 2A: un totale di 20 piccoli per gruppo (10 maschi e 10 femmine per gruppo; un maschio e una femmina per nidiata) destinati a prove neurocomportamentali seguite da valutazione neuroistopatologica in età adulta.

Coorte 2B: un totale di 20 piccoli per gruppo (10 maschi e 10 femmine per gruppo; un maschio e una femmina per nidiata) destinati alla valutazione neuroistopatologica allo svezzamento (PND 21 o PND 22). Se il numero degli animali è insufficiente, vanno assegnati in priorità alla coorte 2A.

Coorte 3: un totale di 20 piccoli per gruppo (10 maschi e 10 femmine per gruppo; uno per nidiata, ove possibile) Potrebbe essere necessario attingere a ulteriori piccoli del gruppo di controllo, che servono come controllo positivo nella prova di risposta anticorpale T-dipendente (TDAR), al PND 56 ± 3 .

34. Se una nidiata non ha abbastanza piccoli per tutte le coorti, la precedenza va assegnata alla coorte 1, che può in seguito produrre una generazione F_2 . È possibile assegnare un numero maggiore di piccoli a una qualsiasi delle coorti in caso di sospetti specifici, ad esempio, se si suppone che un prodotto chimico sia neurotossico, immunotossico o tossico per la riproduzione. Questi piccoli possono essere utilizzati per esami svolti in momenti diversi o per la valutazione di endpoint supplementari. I piccoli non assegnati alle coorti saranno oggetto di un esame biochimico clinico (paragrafo 55) e di autopsia macroscopica (paragrafo 68).

Secondo accoppiamento degli animali P

35. In genere si sconsiglia un secondo accoppiamento per gli animali P perché provoca una perdita di informazioni importanti sul numero dei siti di impianto (e quindi una perdita di dati post-impianto e perinatali, indicatori di un'eventuale azione teratogena) per la prima figliata. Se è necessario verificare o chiarire un dato effetto nelle femmine esposte è meglio estendere lo studio in modo da includere un accoppiamento della generazione F_1 . Tuttavia, è sempre possibile procedere a un secondo accoppiamento di maschi P con femmine non trattate per chiarire risultati ambigui o per meglio caratterizzare gli effetti sulla fertilità osservati in seguito al primo accoppiamento.

OSSERVAZIONI IN VIVO

Osservazioni cliniche

36. Gli animali P e F_1 selezionati sono sottoposti a un'osservazione clinica generale una volta al giorno. Nel caso l'esposizione avvenga tramite sonda gastrica, l'osservazione clinica deve essere svolta prima e dopo la somministrazione della dose (alla ricerca di eventuali segni di tossicità associati ai picchi di concentrazione plasmatica). Occorre registrare i cambiamenti del comportamento pertinenti, i segni di parto difficoltoso o prolungato e tutti i segni di tossicità. Due volte al giorno, o una volta al giorno durante il fine settimana, occorre sorvegliare i segni di grave tossicità, la morbidità e la mortalità sull'insieme degli animali.
37. Inoltre, un esame più dettagliato dell'insieme degli animali P e F_1 (dopo lo svezzamento) viene effettuato su base settimanale, ad esempio in occasione di una pesatura dell'animale in modo da ridurre al minimo lo stress da manipolazione. È necessario svolgere e registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti dal laboratorio che esegue la prova. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di prova. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività neurovegetativa (per esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito). Verranno inoltre registrate le modifiche osservate nel comportamento, nella postura e nella risposta alla manipolazione, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, stereotipia (per esempio tolettatura eccessiva, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (per esempio automutilazione, marcia a ritroso).

Peso corporeo e consumo di cibo/acqua

38. Gli animali P vengono pesati il primo giorno della somministrazione e, successivamente, a cadenza almeno settimanale. Inoltre, le femmine P vengono pesate durante l'allattamento negli stessi giorni di pesatura dei piccoli della loro nidiata (cfr. paragrafo 44). Tutti gli animali F_1 sono pesati individualmente allo svezzamento (PND 21) e, successivamente, a cadenza almeno settimanale. Il peso corporeo va registrato anche il giorno in cui raggiungono la pubertà (completamento della separazione prepuziale o dell'apertura vaginale). Tutti gli animali sono pesati al momento della soppressione.
39. Nel corso dello studio, il consumo di cibo e acqua (nel caso di somministrazione della sostanza in esame nell'acqua da bere) sono registrati almeno settimanalmente negli stessi giorni in cui viene registrato il peso corporeo degli animali (salvo durante la coabitazione). Il consumo di cibo di ciascuna gabbia di animali F_1 viene registrato settimanalmente a cominciare da quando vengono assegnati a una particolare coorte.

Cicli estrali

40. Se sono disponibili informazioni preliminari sugli effetti della sostanza in esame sul ciclo estrale, provenienti da precedenti studi di tossicità a dosi ripetute, è possibile utilizzarle per impostare un protocollo per lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione mirata alla sostanza in esame. Normalmente la valutazione della ciclicità estrale (mediante citologia vaginale) verrà avviata all'inizio del periodo di trattamento e continuerà fino alla conferma dell'avvenuto accoppiamento o alla fine del periodo di accoppiamento di due settimane. Se le femmine sono state sottoposte a controllo della normalità dei cicli estrali prima del trattamento, è utile ripetere gli strisci vaginali dopo l'inizio del trattamento; ma se si temono effetti non specifici all'inizio del trattamento (ad esempio, una marcata riduzione nel consumo di cibo), è possibile lasciare agli animali un massimo di due settimane per adattarsi al trattamento, per poi dare inizio alle due settimane di osservazione degli strisci che precedono l'accoppiamento. Se il periodo di trattamento delle femmine viene così esteso (raggiungendo quindi un periodo di trattamento di 4 settimane prima dell'accoppiamento), si deve considerare l'opportunità di acquistare animali più giovani e di estendere il periodo di trattamento dei maschi prima dell'accoppiamento. Durante il prelievo delle cellule vaginali/cervicali occorre prestare attenzione a non ledere la mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogravidanza (10) (11).
41. Gli strisci vaginali vanno esaminati quotidianamente per tutte le femmine F_1 della coorte 1A, a partire dall'apertura vaginale fino all'osservazione delle prime cellule cheratinizzate, in modo da poter determinare l'intervallo di tempo tra i due eventi. Occorre anche monitorare per due settimane i cicli estrali di tutte le femmine F_1 della coorte 1A, a partire all'incirca dal PND 75. Inoltre, se è necessario fare accoppiare la generazione F_1 , la citologia vaginale della femmine della coorte 1B sarà eseguita a partire dalla formazione delle coppie finché la copulazione sarà comprovata.

Accoppiamento e gravidanza

42. Oltre agli endpoint standard (ad esempio: peso corporeo, assunzione di cibo, osservazioni cliniche che comprendono i controlli sulla mortalità/morbilità), vengono registrate anche le date dell'accoppiamento, dell'inseminazione e del parto; vengono inoltre calcolati l'intervallo precoitale (dalla formazione delle coppie all'inseminazione) e la durata della gestazione (dall'inseminazione al parto). Le femmine P vanno esaminate con attenzione al momento previsto per il parto, per rilevare eventuali sintomi di distocia. Occorre registrare ogni anomalia nel comportamento di nidificazione o allattamento.
43. Il giorno in cui avviene il parto corrisponde, per la madre, al giorno 0 dell'allattamento (DL 0) e, per la progenie, al giorno 0 dalla nascita (PND 0). In alternativa, è possibile contare i giorni a partire dalla copulazione per evitare errori nei dati sullo sviluppo postnatale dovuti alle differenze nella durata della gestazione; è tuttavia necessario contare i giorni anche a partire dal parto: ciò è particolarmente importante quando la sostanza in esame influenza la durata della gestazione.

Parametri relativi alla progenie

44. Ciascuna nidiata va esaminata non appena possibile dopo il parto (PND 0 oppure 1) per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, gli individui nati morti e quelli nati vivi, e individuare eventuali anomalie macroscopiche (anomalie visibili, che includono: palatoschisi, emorragie sottocutanee, anomalie nel colore o nella struttura della pelle, presenza del cordone ombelicale, assenza di latte nello stomaco, presenza di secrezioni secche). Inoltre, il primo esame clinico dei neonati deve comprendere una valutazione qualitativa della temperatura corporea, dello stato di attività e della reazione alle manipolazioni. I piccoli trovati morti il PND 0 o successivamente vanno esaminati alla ricerca di possibili difetti e della causa del decesso. I piccoli vivi sono contati e pesati individualmente il PND 0 oppure 1, e successivamente a intervalli periodici; ad esempio: PND 4, 7, 14 e 21. Gli esami clinici, che dipendono dall'età degli animali, vanno ripetuti ogni volta che la progenie viene pesata, o più spesso

se sono stati rilevati casi specifici alla nascita. I segni da sorvegliare possono includere (la lista non è esaustiva): anomalie esterne, alterazioni a livello della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, comparsa di secrezioni ed escrezioni, attività autonoma. Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti tonici o clonici, stereotipie e qualsiasi comportamento insolito.

45. Occorre misurare almeno una volta la distanza anogenitale (AGD) di ogni piccolo, tra il PND 0 e il PND 4. Il peso corporeo del piccolo va registrato quando ne viene misurata l'AGD, che viene normalizzata in funzione della taglia, preferibilmente usando la radice cubica del peso corporeo (12). Va controllata la presenza di capezzoli/areole nei piccoli di sesso maschile al PND 12 o 13.
46. In tutti gli animali F_1 selezionati viene valutata quotidianamente la presenza di separazione balano-prepuziale, nei maschi, e apertura vaginale, nelle femmine, a cominciare da prima della data prevista per la comparsa di tali endpoint, in modo da verificare l'insorgere prematuro della maturazione sessuale. Occorre registrare eventuali anomalie degli organi genitali, quali persistente filamento vaginale, ipospadia o pene bifido. La maturità sessuale degli animali F_1 va confrontata con lo sviluppo fisico, determinando età e peso corporeo al momento dell'apertura vaginale o della separazione balano-prepuziale, nelle femmine e nei maschi rispettivamente (13).

Valutazione della potenziale neurotossicità per lo sviluppo (coorti 2A e 2B)

47. Per la valutazione della neurotossicità occorre utilizzare esemplari delle coorti 2A e 2B, con dieci maschi e dieci femmine per ciascuna coorte e per ciascun gruppo di trattamento (per ogni coorte: 1 maschio o una femmina per nidata; tutte le nidate rappresentate da almeno un piccolo; selezione casuale). Gli animali della coorte 2A vengono sottoposti a una serie di osservazioni funzionali, alla valutazione del riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro e dell'attività motoria (cfr. paragrafi 48-50) e a una valutazione neuropatologica (cfr. paragrafi 74-75). Si cercherà in particolare modo di ridurre al minimo le variazioni che influenzano le condizioni di prova assicurandosi che non siano legate sistematicamente al trattamento. Tra le variabili che possono incidere sul comportamento figurano il livello sonoro (ad esempio il rumore intermittente), la temperatura, l'umidità, l'illuminazione, gli odori, l'ora del giorno, e le distrazioni legate all'ambiente. I risultati delle prove di neurotossicità vanno interpretati in relazione ad adeguati range di riferimento con controlli storici. La valutazione neuropatologica degli animali della coorte 2B va svolta al PND 21 o 22 (cfr. paragrafi 74-75).
48. Al PND 24 (± 1 giorno) va condotto un test per il riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro sugli animali della coorte 2A. La valutazione dei gruppi trattati e di controllo è ripartita in modo equilibrato nel corso della giornata. Ciascuna sessione comprende 50 prove. Per questo tipo di test auditivo, va calcolata l'ampiezza della risposta media su ciascun blocco di 10 prove (5 blocchi di 10 prove ciascuno), ottimizzando le condizioni per permettere un periodo di adattamento intra-sessione. Questi protocolli devono essere conformi al metodo di prova B.53 (35).
49. Tra il PND 63 e il PND 75, si sceglierà il momento opportuno per svolgere una serie di osservazioni funzionali sugli animali della coorte 2A, nonché una prova automatizzata concernente l'attività motoria. Questi protocolli devono essere conformi ai metodi di prova B.43 (33) e B.53 (35). La serie di osservazioni funzionali comprende una descrizione approfondita dell'aspetto, del comportamento e dell'integrità funzionale dei soggetti. La descrizione si basa sull'osservazione dei soggetti prima nelle gabbie di stabulazione e poi in un apposito recinto standard di osservazione (campo aperto) dove l'animale è libero di muoversi, nonché su prove di manipolazione. Le prove saranno svolte per ordine crescente di interattività. Un elenco delle misure è presentato nell'appendice 1. Tutti gli animali sono esaminati attentamente da osservatori preparati che ignorano il trattamento ricevuto dagli animali, secondo protocolli standardizzati che riducono al minimo la variabilità dipendente dall'osservatore. Ove possibile, è consigliabile che sia il medesimo osservatore a valutare tutti gli animali in una stessa prova. Se ciò non fosse possibile, è necessario dimostrare l'affidabilità tra gli osservatori. Per ciascun parametro della batteria di test comportamentali occorre utilizzare scale di punteggi e criteri di valutazione il cui modo operativo sia esplicitamente definito. Se possibile, vanno stabilite misure quantitative oggettive per le osservazioni che implicano un punteggio soggettivo. Per quanto riguarda l'attività motoria, ogni animale è sottoposto a prova individuale. La sessione di prova deve essere sufficientemente lunga da consentire di dimostrare l'adattamento intra-sessione degli animali di controllo. L'attività motoria va monitorata tramite un apparecchio automatico che la registra, in grado di rilevarne sia l'aumento che la diminuzione (ciò vuol dire che il livello dell'attività di partenza misurata dall'apparecchio non deve essere così basso da escludere la possibilità di rilevarne la diminuzione, né così alto da impedire di rilevarne l'aumento). Tutti gli apparecchi vengono tarati secondo protocolli standard per assicurare, nella misura del possibile, l'affidabilità delle operazioni svolte da dispositivi diversi in giorni diversi. Nella misura del possibile, occorre bilanciare i diversi gruppi di trattamento destinati ai diversi dispositivi. I gruppi di trattamento vanno ripartiti sull'arco della giornata per tener conto dei ritmi circadiani di attività.
50. Se le informazioni esistenti segnalano la necessità di svolgere altre prove funzionali (ad esempio sensoriali, sociali, cognitive), queste ultime andranno integrate nel protocollo senza compromettere l'integrità delle altre valutazioni previste. Se vengono svolte ulteriori prove sugli stessi animali utilizzati per il test sul riflesso di trasalimento, per

la serie di osservazioni funzionali o per le prove sull'attività motoria, occorre programmarle in modo tale da ridurre al minimo il rischio di compromettere l'integrità delle prime. Quando l'osservazione empirica, gli effetti previsti o diversi aspetti legati al meccanismo o alla modalità d'azione suggeriscono un tipo specifico di neurotossicità, possono rivelarsi particolarmente utili dei protocolli supplementari.

Valutazione del potenziale di immunotossicità per lo sviluppo (coorte 3)

51. Al PND 56 ($\pm$ 3 giorni), 10 maschi e 10 femmine della coorte 3 per ogni gruppo di trattamento (1 maschio e 1 femmina per nidiata; tutte le nidiatae rappresentate da almeno 1 piccolo; selezione casuale) saranno sottoposti a una prova di risposta anticorpale T-dipendente, per cercare anticorpi IgM prodotti nel corso della risposta primaria a un antigene dipendente dai linfociti T, per esempio gli eritrociti di pecora (*Sheep Red Blood Cells*, SRBC) o l'emocianina di patella (*Keyhole Limpet Hemocyanin*, KLH); queste prove devono essere conformi agli attuali protocolli sperimentali dell'immunotossicità (14) (15). La risposta può essere valutata contando il numero specifico di cellule che formano placche (PFC) nella milza o determinando il titolo di anticorpi IgM specifici per SRBC o KLH nel siero con la prova ELISA, al picco della risposta. In generale tale picco si raggiunge dopo quattro (conteggio PFC) o cinque (ELISA) giorni dall'immunizzazione per via endovenosa. Se la risposta primaria degli anticorpi viene valutata tramite conteggio delle PFC, è possibile suddividere gli animali in sottogruppi valutati in giorni diversi, alle seguenti condizioni: l'intervallo tra l'immunizzazione e la soppressione di un sottogruppo deve essere stabilito in modo che le PFC siano conteggiate al picco della risposta; i sottogruppi devono contenere uno stesso numero di discendenti maschi e femmine provenienti da tutti i gruppi-dose, compresi i controlli; i sottogruppi devono essere valutati all'incirca alla stessa età postnatale. L'esposizione alla sostanza in esame continuerà fino al giorno prima di raccogliere le milze per la risposta PFC o il siero con il metodo ELISA.

Valutazione ulteriore del potenziale di tossicità per la riproduzione (coorte 1B)

52. È possibile continuare a somministrare il trattamento agli animali della coorte 1B al di là del PND 90, continuando ad allevarli per ottenere una generazione F₂ se necessario. I maschi e le femmine appartenenti a uno stesso gruppo-dose possono coabitare (evitando che si formino coppie di individui della stessa nidiata) per altre due settimane a partire dal PND 90 ma non oltre il PND 120. I protocolli saranno simili a quelli previsti per gli animali P. Tuttavia, basandosi sul peso dell'evidenza, può essere sufficiente sopprimere le nidiatae al PND 4 invece che valutarle sino allo svezzamento od oltre.

OSSERVAZIONI FINALI

Biochimica clinica/Ematologia

53. Occorre sorvegliare gli effetti sistemici negli animali P. Vengono prelevati, a digiuno, campioni di sangue da un sito specifico in dieci maschi e dieci femmine P per gruppo-dose, selezionati casualmente al momento della soppressione; i campioni vengono conservati in condizioni adeguate e sono sottoposti a esame ematologico parziale o completo, a un esame biochimico clinico, a un dosaggio di T4 e TSH, o ad altri esami suggeriti dalla conoscenza del profilo degli effetti della sostanza in esame [cfr. documento di orientamento OCSE n. 151 (40)]. Occorre valutare i seguenti parametri ematologici: ematocrito, concentrazione di emoglobina, conteggio degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, numero di piastrine e misura del tempo e del potenziale di coagulazione. Le analisi del plasma o del siero comprenderanno il glucosio, il colesterolo totale, l'urea, la creatinina, le proteine totali, l'albumina e almeno due enzimi indicatori degli effetti epatocellulari (come l'alanina aminotransferasi, l'aspartato aminotransferasi, la fosfatasi alcalina, la gamma-glutamyl transpeptidasi e la sorbitolo deidrogenasi). In alcuni casi, il dosaggio di enzimi supplementari e degli acidi biliari può fornire indicazioni utili. Inoltre, è possibile conservare prelievi di sangue da tutti gli animali in vista di ulteriori analisi destinate a chiarire in un secondo tempo gli effetti ambigui o per generare dati interni sull'esposizione. Se non si intende procedere a un secondo accoppiamento di animali P, i campioni sono prelevati al momento della soppressione o nel periodo immediatamente precedente. Se gli animali sono mantenuti in vita, si deve procedere ai prelievi pochi giorni prima del secondo accoppiamento. Inoltre, a meno che precedenti studi a dose ripetuta indichino che la sostanza in esame non influisce su questo parametro, occorre procedere a un'analisi delle urine prima della soppressione, valutando i seguenti elementi: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio, sangue e cellule ematiche, detriti cellulari. Possono essere prelevati campioni di urine anche per monitorare l'escrezione della sostanza in esame e/o di metaboliti.
54. Gli effetti sistemici devono essere monitorati anche negli animali F₁. Al momento della soppressione vengono prelevati, a digiuno, campioni di sangue da un sito specifico in dieci maschi e dieci femmine selezionati casualmente per ciascun gruppo-dose nella coorte 1A; i campioni sono conservati in condizioni adeguate e sottoposti a un esame biochimico clinico standard, compresa la valutazione della concentrazione sierica per gli ormoni tiroidei (T4 e TSH), un esame ematologico (conteggio totale e differenziato dei leucociti, conteggio degli eritrociti) e analisi delle urine.

55. I piccoli in eccedenza al PND 4 sono sottoposti ad autopsia macroscopica nel corso della quale è possibile valutare la concentrazione sierica degli ormoni tiroidei (T4). Se necessario, i campioni di sangue dei neonati (PND 4) possono essere raggruppati per nidiata per svolgere analisi biochimiche e sul dosaggio degli ormoni tiroidei. Campioni di sangue sono prelevati anche dai soggetti appena svezzati sottoposti ad autopsia macroscopica il PND 22 (piccoli F₁ non selezionati per una coorte) al fine di analizzare la T4 e la TSH.

Parametri relativi allo sperma

56. I parametri relativi allo sperma vanno misurati in tutti i maschi della generazione P, a meno che non vi siano dati esistenti che dimostrino che tali parametri non subiscono modifiche nel corso di uno studio su 90 giorni. L'esame dei parametri dello sperma va effettuato su tutti i maschi della coorte 1A.
57. Al momento della soppressione, il peso dei testicoli e degli epididimi va registrato per tutti i maschi P e F₁ (coorte 1A). Occorre conservare almeno un testicolo e un epididimo per l'esame istopatologico. L'epididimo rimasto serve a contare le riserve di spermatozoi nella coda dell'epididimo (16) (17). Inoltre, gli spermatozoi della coda dell'epididimo (o del dotto deferente) vengono raccolti con modalità tali da ridurre al minimo i danni per la valutazione della loro motilità e morfologia (18).
58. La motilità degli spermatozoi viene valutata subito dopo la soppressione oppure videoregistrata per un'analisi successiva. La percentuale di spermatozoi progressivamente mobili può essere determinata soggettivamente od oggettivamente attraverso un'analisi computerizzata del movimento (19) (20) (21) (22) (23) (24). Per valutare la morfologia degli spermatozoi si esaminano campioni di sperma prelevato nell'epididimo (o nel dotto deferente) in preparazioni fissate o umide (25); almeno 200 spermatozoi per campione vengono classificati come normali (se sia la testa che la parte centrale/coda appaiono normali) o anormali. Esempi di anomalie morfologiche degli spermatozoi: fusione, teste isolate e deformazioni di testa e/o coda (26). Teste deformate o larghe possono indicare anomalie nella spermiazione.
59. Se i campioni di sperma vengono congelati, gli strisci fissati e le immagini della motilità degli spermatozoi registrate al momento dell'autopsia (27), le ulteriori analisi possono limitarsi ai maschi ai quali sono state somministrate dosi elevate e ai maschi di controllo. Tuttavia, se si osservano effetti dovuti al trattamento occorre valutare anche i gruppi trattati con dosi inferiori.

Autopsia macroscopica

60. Subito dopo la soppressione o il decesso nel corso dello studio, tutti gli animali P e F₁ sono sottoposti ad autopsia macroscopica alla ricerca di eventuali anomalie strutturali o alterazioni patologiche. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttore. I piccoli moribondi che vengono soppressi con metodi non cruenti e i piccoli deceduti vanno registrati e, quando non macerati, vanno esaminati alla ricerca di possibili difetti e/o della causa del decesso e successivamente conservati.
61. Uno striscio vaginale delle femmine adulte P e F₁ viene esaminato il giorno dell'autopsia per determinare lo stadio del ciclo estrale e consentire di stabilire correlazioni con l'istopatologia degli organi riproduttivi. Occorre esaminare gli uteri di tutte le femmine P (e femmine F₁, se applicabile) senza compromettere l'esame istopatologico, per verificare la presenza di siti di impianto e conteggiarli.

Pesatura degli organi e conservazione dei tessuti — Animali adulti P e F₁

62. A soppressione avvenuta e non appena ciò sia possibile dopo la dissezione (per evitare l'essiccamento), vengono determinati il peso corporeo e il peso umido degli organi di seguito elencati di tutti gli animali P e degli adulti F₁ delle coorti pertinenti (cfr. in appresso). Gli organi vanno in seguito conservati in condizioni adeguate. Se non altrimenti specificato, gli organi a coppie possono essere pesati individualmente o insieme, a seconda della prassi vigente nel laboratorio.

— Utero (con ovidotti e collo dell'utero), ovaie.

— Testicoli, epididimi (totalità e coda per i campioni usati nella conta spermatica).

— Prostata (insieme delle porzioni dorsolaterali e ventrali). Occorre prelevare con cautela l'insieme della prostata in modo da evitare di perforare le vescicole seminali piene di liquido. Se il trattamento ha inciso sul peso totale della prostata, occorre procedere cautamente alla dissezione delle porzioni dorsolaterali e ventrali, che vanno pesate separatamente previa fissazione.

- Vescicole seminali con ghiandole della coagulazione e relativi liquidi (come un'unica unità).
 - Cervello, cuore, fegato, reni, milza, timo, ipofisi, tiroide (previa fissazione), ghiandole surrenali e organi o tessuti bersaglio conosciuti.
63. Oltre agli organi elencati sopra, occorre conservare, in condizioni adeguate: campioni di nervo periferico, muscolo, midollo spinale, occhio più nervo ottico, tratto gastrointestinale, vescica, polmone, trachea (con tiroide e paratiroidi), midollo osseo, dotto deferente (maschi), ghiandola mammaria (maschi e femmine) e vagina.
64. Gli organi degli animali della coorte 1A vengono tutti pesati e conservati per l'esame istopatologico.
65. Per valutare gli effetti immunotossici indotti pre- e post-nascita, al momento della soppressione occorre sottoporre 10 maschi e 10 femmine della coorte 1A per ciascun gruppo di trattamento (un maschio e una femmina per nidata; ogni nidata rappresentata da almeno un piccolo; selezione casuale) agli esami elencati di seguito:
- pesatura dei linfonodi sia associati alla via di esposizione sia distanti da essa (oltre alla pesatura di ghiandole surrenali, timo e milza, già svolta per tutti gli animali della coorte 1A);
 - analisi delle sottopopolazioni linfocitarie spleniche (lifociti T CD4+ e CD8+, linfociti B, e cellule natural killer NK) usando una metà della milza; l'altra metà della milza va conservata per l'esame istopatologico.
- L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie spleniche in animali non immunizzati (coorte 1A) stabilirà se l'esposizione contribuisce a un cambiamento dell'equilibrio immunologico relativo alla distribuzione dei linfociti timici ausiliari (CD 4+) o citotossici (CD 8+) o delle cellule NK (risposte rapide alle cellule neoplastiche e ai patogeni).
66. Occorre pesare gli organi elencati di seguito degli animali della coorte 1B e trattare i relativi tessuti fino alla trasformazione in blocchi:
- vagina (non pesata)
 - utero, collo dell'utero compreso
 - ovaie
 - testicoli (almeno uno)
 - epididimi
 - vescicole seminali e ghiandole della coagulazione
 - prostata
 - ipofisi
 - organi bersaglio conosciuti

Si procederà a svolgere l'esame istopatologico della coorte 1B solo se i risultati della coorte 1A sono ambigui o se si sospetta che la sostanza somministrata sia tossica per la riproduzione o per il sistema endocrino.

67. Coorti 2A e 2B: prova di neurotossicità nella fase dello sviluppo (PND 21 o 22 e discendenti adulti). Gli animali della coorte 2A sono soppressi dopo le prove comportamentali, il loro cervello viene pesato e sottoposto a un esame istopatologico completo per una valutazione della neurotossicità. Gli animali della coorte 2B vengono soppressi il PND 21 o 22, il loro cervello viene pesato e in seguito sottoposto a esame microscopico per una valutazione della neurotossicità. La fissazione per perfusione è indispensabile per gli animali della coorte 2A mentre è facoltativa per quelli della coorte 2B, conformemente al metodo di prova B.53 (35).

Pesatura degli organi e conservazione dei tessuti — Animali appena svezzati F₁

68. I piccoli non selezionati per le diverse coorti, inclusi quelli più piccoli del normale, vengono soppressi non appena svezzati (PND 22), tranne quando i risultati indicano che è necessario procedere ad altri esami in vivo. I piccoli soppressi sono sottoposti ad autopsia macroscopica, compresa una valutazione degli organi riproduttivi, come descritto ai paragrafi 62 e 63. Cervello, milza e timo vanno pesati e conservati in condizioni adeguate per un massimo di 10 piccoli per sesso e per gruppo, provenienti dal maggior numero possibile di nidate. Inoltre, i tessuti mammari di questi piccoli, femmine e maschi, possono essere conservati per un'ulteriore analisi microscopica ⁽¹⁾ [cfr. documento di orientamento OCSE n. 151 (40)]. Vanno inoltre conservati i tessuti bersaglio ed eventuali anomalie macroscopiche, per un eventuale esame istologico.

⁽¹⁾ La ricerca ha dimostrato che la ghiandola mammaria, soprattutto nei primi stadi di vita, è un endpoint sensibile per le sostanze con attività estrogenica. Si raccomanda quindi di includere nel presente metodo di prova, previa validazione, degli endpoint basati sulle ghiandole mammarie dei piccoli di entrambi i sessi.

Istopatologia — Animali P

69. Occorre svolgere un esame istopatologico completo degli organi elencati ai paragrafi 62 e 63 su tutti gli animali P di controllo e del gruppo di trattamento a dose elevata. È inoltre opportuno esaminare gli organi di tutti gli animali ai quali sono state somministrate dosi inferiori e che evidenziano alterazioni imputabili alla sostanza in esame, al fine di determinare il NOAEL. Inoltre, vanno sottoposti a esame istopatologico gli organi riproduttivi e tutte le lesioni macroscopiche di tutti gli animali nei quali si sospetta una riduzione della fertilità, ad esempio gli esemplari che non si sono accoppiati, non hanno concepito, non hanno generato o non hanno partorito prole sana, o nei quali si sono osservati effetti sul ciclo estrale o sul numero, sulla motilità o sulla morfologia degli spermatozoi.

Istopatologia — animali F₁*Animali della coorte 1*

70. È necessario svolgere un esame istopatologico completo degli organi elencati ai paragrafi 62 e 63 degli animali di controllo o ai quali è stata somministrata una dose elevata della coorte 1A. Tutte le nidiate devono essere rappresentate da almeno 1 piccolo per sesso. È inoltre opportuno esaminare gli organi e i tessuti che evidenziano alterazioni imputabili al trattamento, nonché tutte le lesioni macroscopiche, presso tutti gli animali ai quali sono state somministrate dosi inferiori, al fine di determinare un NOAEL. La valutazione degli effetti pre- e postnatali sugli organi linfatici richiede anche un esame istopatologico dei linfonodi e del midollo osseo da svolgere su 10 maschi e 10 femmine della coorte 1A, che si affianca all'esame istopatologico del timo, della milza e delle ghiandole surrenali già eseguito su tutti gli animali 1A.
71. I tessuti riproduttivi ed endocrini della totalità degli individui della coorte 1B trattati fino alla trasformazione in blocchi (come descritto al paragrafo 66) vanno sottoposti ad esame istopatologico in caso di agenti sospettati di essere tossici per la riproduzione o per il sistema endocrino. Occorre sottoporre anche la coorte 1B ad esame istologico se i risultati della coorte 1A sono ambigui.
72. Le ovaie delle femmine adulte devono contenere follicoli primordiali e in crescita, nonché corpi lutei; pertanto, occorre svolgere un esame istopatologico delle femmine F₁ per quantificare follicoli primordiali, piccoli follicoli in crescita, nonché corpi lutei; il numero di animali, la selezione delle sezioni ovariche e le dimensioni dei campioni devono essere statisticamente adeguati al protocollo di analisi applicato. È possibile procedere alla conta dei follicoli in primo luogo negli animali di controllo e in quelli trattati con dose elevata; in caso di effetti nocivi in questi ultimi, occorre esaminare anche gli animali trattati con dosi inferiori. L'esame deve comprendere la conta del numero dei follicoli primordiali, che può essere combinata con i follicoli piccoli in crescita per il confronto tra le ovaie dei soggetti trattati e dei controlli [cfr. documento di orientamento OCSE n. 151 (40)]. La valutazione dei corpi lutei va effettuata in parallelo con le prove sulla ciclicità estrale, in modo da poter prendere in considerazione la fase del ciclo. Va valutato se lo sviluppo specifico degli ovidotti, dell'utero e della vagina rientra nella norma.
73. Si svolgeranno esami istopatologici testicolari approfonditi sui maschi F₁, per identificare effetti imputabili al trattamento sulla differenziazione e sullo sviluppo dei testicoli nonché sulla spermatogenesi (38). Se possibile, esaminare sezioni di rete testis. Va verificato che lo sviluppo specifico per testa, corpo e coda dell'epididimio e per il dotto deferente sia nella norma, e vanno valutati i parametri necessari per i maschi P.

Animali della coorte 2

74. È necessario svolgere un esame neuroistopatologico su tutti gli animali di controllo e del gruppo di trattamento a dose elevata della coorte 2A, per sesso, subito dopo i test neurocomportamentali (dopo il PND 75, ma non oltre il PND 90). Al PDN 21 o 22 occorre svolgere un esame istopatologico del cervello su tutti gli animali di controllo e del gruppo di trattamento a dose elevata della coorte 2B, per sesso. È inoltre opportuno esaminare gli organi o i tessuti di tutti gli animali ai quali sono state somministrate dosi inferiori e che evidenziano alterazioni imputabili alla sostanza in esame, al fine di determinare il NOAEL. Per gli animali delle coorti 2A e 2B, si esaminano molteplici sezioni del cervello per permettere la valutazione di bulbi olfattivi, corteccia cerebrale, ippocampo, gangli basali, talamo, ipotalamo, mesencefalo (tetto, tegmento e peduncoli cerebrali), midollo allungato e cervelletto. Solo per la coorte 2A, si esaminano occhi (retina e nervo ottico) e campioni del nervo periferico, del muscolo e del midollo spinale. Questi protocolli neuroistologici devono essere conformi al metodo di prova B.53 (35).
75. Parti rappresentative del cervello (sezioni omologhe attentamente selezionate in base a indicatori microscopici affidabili) vengono sottoposte a un esame morfometrico (quantitativo), che può comprendere misure lineari e/o della superficie di specifiche regioni del cervello. Si effettueranno almeno tre sezioni consecutive per ciascun indicatore morfologico (livello) in modo da poter scegliere le più omologhe e rappresentative per l'area specifica del cervello da valutare. Il neuropatologo deciderà se le sezioni preparate per essere misurate sono omologhe agli altri

campioni raccolti e se sono dunque adatte ad essere misurate, in quanto le misure lineari, in modo particolare, possono variare su distanze relativamente brevi (28). Le sezioni non omologhe vanno escluse. Sebbene l'obiettivo sia il prelievo di campioni da tutti gli animali selezionati a questo scopo (10/sexso/livello di dose), è accettabile ricorrere a un numero inferiore di campioni. Tuttavia i prelievi da meno di 6 animali/sexso/livello di dose non sono in genere ritenuti sufficienti ai fini del presente metodo di prova. Il ricorso alla stereologia è utile per identificare gli effetti riconducibili al trattamento su parametri quali il volume o il numero di cellule di specifiche regioni neuroanatomiche. Tutti gli aspetti della preparazione dei campioni tissutali — dalla fissazione dei tessuti alla dissezione dei campioni di tessuto, al trattamento dei tessuti, alla colorazione dei vetrini — devono seguire un modello sperimentale equilibrato, che preveda per ciascun lotto una quantità di campioni rappresentativi di ogni gruppo-dose. Quando è necessario svolgere analisi morfometriche o stereologiche, occorre includere simultaneamente il tessuto cerebrale in mezzi adatti per tutti i livelli di dose, per evitare la coartazione, artefatto che può insorgere durante la conservazione prolungata nel fissativo.

RELAZIONI

Dati

76. I dati devono essere riportati individualmente e riassunti sotto forma di tabella. Ove pertinente, vengono presentate le seguenti informazioni per ciascun gruppo di prova e ciascuna generazione: il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti nel corso della prova o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso/eutanasia, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di femmine che hanno partorito una nidiata e il numero di animali che presentano segni di tossicità. La relazione deve inoltre contenere una descrizione della tossicità, compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità.
77. È necessario valutare i risultati numerici mediante un metodo statistico adeguato e riconosciuto. I metodi statistici sono parte integrante del modello sperimentale; devono trattare in modo pertinente i dati non normali (ad esempio i risultati delle conte), i dati censurati (ad esempio a causa di un tempo di osservazione limitato), la non-indipendenza (ad esempio gli effetti sulle nidiate e le misurazioni ripetute) e le varianze ineguali. I modelli lineari generalizzati misti e i modelli dose-risposta coprono un largo ventaglio di strumenti di analisi che possono essere adatti a trattare i dati ottenuti nel quadro di questo metodo di prova. La relazione deve comprendere sufficienti informazioni sul metodo di analisi e sul programma informatico utilizzati, in modo da consentire a un revisore o a un esperto di statistica indipendente di valutare/rivalutare l'analisi.

Valutazione dei risultati

78. I reperti vanno valutati in base agli effetti osservati, ivi compreso in sede di autopsia e all'esame microscopico. La valutazione include il rapporto, o l'assenza di rapporto, tra dose e presenza, incidenza e gravità delle anomalie, comprese le lesioni macroscopiche. Vanno inoltre valutati gli organi bersaglio, la fertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva e le nidiate, le variazioni del peso corporeo, la mortalità e qualsiasi altro effetto tossico e sullo sviluppo. Occorre prestare particolare attenzione alle alterazioni specifiche a ciascun sesso. Nella valutazione dei risultati della prova occorre tenere conto delle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame e, quando disponibili, dei dati tossicocinetici, inclusi il trasferimento placentare e l'escrezione nel latte.

Relazione sulla prova

79. La relazione deve comprendere le seguenti informazioni, ottenute tramite il presente studio condotto su animali P, F₁ e F₂ (ove pertinente).

Sostanza chimica in esame:

- tutte le informazioni pertinenti disponibili sulla sostanza in esame, le sue proprietà chimiche, tossicocinetiche e tossicodinamiche;
- dati identificativi;
- purezza.

Mezzo disperdente (se del caso):

- giustificazione per la scelta del mezzo disperdente utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

- specie/ceppo utilizzato;
- numero, età e sesso degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, materiali per la preparazione del nido ecc.;
- peso di ciascun animale all'inizio della prova;
- risultati dello striscio vaginale delle femmine P prima dell'inizio del trattamento (se i dati sono raccolti in quel particolare momento);
- le registrazioni sulla formazione di coppie della generazione P, che precisano il partner di sesso maschile e di sesso femminile e se l'accoppiamento è riuscito;
- nidiata d'origine degli animali adulti della generazione F₁.

Condizioni sperimentali:

- criteri di selezione dei livelli di dose;
- dettagli su formulazione della sostanza chimica in esame/preparazione della dieta, concentrazioni ottenute;
- stabilità e omogeneità della preparazione nel mezzo disperdente o nel vettore (ad esempio cibo, acqua da bere), nel sangue e/o nel latte alle condizioni d'uso e magazzinaggio tra le utilizzazioni;
- modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;
- se del caso, equivalenza tra la concentrazione della sostanza nella dieta/nell'acqua da bere (espressa in ppm) e la dose somministrata (mg/kg di peso corporeo/giorno);
- dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresa la composizione della dieta, se disponibile);
- descrizione dettagliata dei protocolli di randomizzazione utilizzati per selezionare i piccoli da sopprimere e per assegnare quelli restanti ai gruppi sottoposti a prova;
- condizioni ambientali;
- elenco delle persone che hanno partecipato allo studio, specificandone la formazione professionale.

Risultati (sintesi e dati individuali per sesso e per dose):

- consumo di cibo, consumo di acqua (se disponibile), efficienza alimentare (incremento ponderale per grammo di alimenti consumati, tranne che per il periodo di coabitazione e durante la lattazione), e consumo della sostanza in esame (somministrazione attraverso dieta/acqua da bere) per gli animali P e F₁;
- dati sull'assorbimento (se disponibili);
- dati sul peso corporeo degli animali P;
- dati sul peso corporeo dopo lo svezzamento per gli animali F₁ selezionati;
- momento del decesso durante lo studio o indicazione sulla sopravvivenza degli animali alla conclusione della prova;
- natura, gravità e durata dei segni clinici (sia reversibili che non reversibili);
- risultati delle analisi ematologiche, delle urine e di biochimica clinica, compreso il dosaggio di TSH e T4;
- analisi fenotipiche di cellule di milza (cellule T, B, NK);
- cellularità del midollo osseo;
- dati sulla risposta tossica;
- numero di femmine P e F₁ con ciclo estrale normale o anormale e durata del ciclo;
- tempo per l'accoppiamento (intervallo precoitale, numero di giorni tra formazione delle coppie e accoppiamento);
- effetti tossici o altri effetti sulla riproduzione, compreso il numero e la percentuale di animali che riescono ad accoppiarsi, ad essere gravide, a partorire e ad allattare, di maschi che provocano gravidanze, di femmine che presentano segni di distocia/parto prolungato o difficile;
- durata della gestazione e, se disponibile, del parto;
- numero di impianti, dimensioni della nidiata e percentuale di piccoli di sesso maschile;

- numero e percentuale di perdite post-impianto, di nati vivi e di nati morti;
- peso della nidiata e peso dei piccoli (dei maschi, delle femmine, e dell'insieme dei due sessi), numero di esemplari più piccoli del normale, se determinato;
- numero di piccoli con anomalie evidenti;
- effetti tossici o altri effetti sulla progenie, sulla crescita postnatale, sulla sopravvivenza ecc.;
- osservazioni sugli indicatori fisici nei piccoli e altri dati sullo sviluppo post-natale;
- dati sulla maturazione sessuale degli animali F_1 ;
- osservazioni funzionali condotte, secondo la necessità, su piccoli e adulti;
- peso corporeo al momento della soppressione degli animali e dati sul peso assoluto e relativo degli organi negli animali P e negli adulti F_1 ;
- reperti autoptici;
- descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici;
- numero totale degli spermatozoi nella coda dell'epididimo, percentuale di spermatozoi progressivamente mobili, percentuale di spermatozoi morfologicamente normali e percentuale di spermatozoi con ciascuna delle anomalie identificate per i maschi P e F_1 ;
- se del caso, numero e fase di maturazione dei follicoli contenuti nelle ovaie delle femmine P e F_1 ;
- conta dei corpi lutei nelle ovaie delle femmine F_1 ;
- elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Parametri della coorte 2

- descrizione dettagliata dei protocolli utilizzati per standardizzare le osservazioni, e descrizione dei protocolli e delle definizioni operative impiegate per classificare le osservazioni;
- elenco di tutti i protocolli sperimentali utilizzati e giustificazione della loro scelta;
- descrizione particolareggiata dei protocolli comportamentali/funzionali, neuropatologici e morfometrici utilizzati, comprese informazioni e dettagli sugli apparecchi automatici di rilevamento;
- protocolli per tarare e garantire l'equivalenza degli apparecchi e per garantire la composizione equilibrata dei gruppi di trattamento nelle prove;
- breve motivazione delle decisioni basate su un giudizio professionale;
- descrizione dettagliata di tutte le osservazioni comportamentali, funzionali, neuropatologiche e morfometriche per sesso e gruppo-dose, compresi gli incrementi e i decrementi rispetto ai controlli;
- peso del cervello;
- ogni diagnosi formulata alla luce di lesioni e segni neurologici, ivi comprese malattie o condizioni d'insorgenza naturale;
- immagini di reperti emblematici;
- immagini a debole ingrandimento che consentono di valutare l'omologia delle sezioni utilizzate per la morfometria;
- elaborazione statistica dei risultati, compresi i modelli statistici utilizzati per l'analisi dei dati, e i risultati, indipendentemente dal fatto che siano significativi;
- legame tra eventuali altri effetti tossici e le conclusioni circa il potenziale neurotossico della sostanza chimica in esame, per sesso e gruppo-dose;
- ripercussioni delle eventuali informazioni tossicocinetiche sulle conclusioni;
- dati a sostegno dell'attendibilità e della sensibilità del metodo di prova (vale a dire, dati storici di controllo e dati di controllo positivi);
- relazione, se esistente, tra gli effetti neuropatologici e funzionali;
- NOAEL o dose di riferimento per madri e figli, per sesso e gruppo;
- discussione sull'interpretazione generale dei dati basata sui risultati, che espliciti la conclusione a cui si è giunti, ossia se la sostanza chimica esaminata abbia causato o meno neurotossicità nella fase dello sviluppo, con relativo NOAEL.

Parametri della coorte 3

- concentrazione sierica degli anticorpi IgM (sensibilizzazione con SRBC o KLH), o numero di PFC nella milza in risposta agli IgM (sensibilizzazione con SRBC);
- l'esecuzione della prova di risposta anticorpale T-dipendente (TDAR) va confermata nell'ambito del processo di ottimizzazione dal laboratorio che l'allestisce per la prima volta e in seguito periodicamente (per esempio una volta all'anno) da parte di tutti i laboratori;
- discussione sull'interpretazione generale dei dati basata sui risultati, che espliciti la conclusione a cui si è giunti, ossia se la sostanza chimica esaminata abbia causato o meno immunotossicità nella fase dello sviluppo, con relativo NOAEL.

*Discussione dei risultati**Conclusioni, compresi i valori NOAEL per gli effetti sugli animali parentali e sulla progenie*

Vanno fornite tutte le informazioni non ottenute durante lo studio ma utili per l'interpretazione dei risultati (ad esempio, eventuali analogie con effetti dovuti a sostanze neurotossiche note).

Interpretazione dei risultati

80. Uno studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione fornirà informazioni sugli effetti dovuti all'esposizione ripetuta ad una sostanza durante tutte le fasi del ciclo riproduttivo, se del caso. In particolare, lo studio fornisce informazioni sull'apparato riproduttivo nonché sullo sviluppo, la crescita, la sopravvivenza e gli endpoint funzionali della progenie fino al PND 90.
81. L'interpretazione dei risultati dello studio deve tener conto di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica, comprese le proprietà fisico-chimiche, tossicocinetiche e tossicodinamiche, delle informazioni pertinenti disponibili sugli analoghi strutturali e dei risultati degli studi di tossicità precedentemente svolti con la sostanza in esame (ad esempio sulla tossicità acuta, sulla tossicità dopo somministrazione ripetuta, gli studi meccanicistici e quelli per valutare se eventualmente sussistano notevoli differenze qualitative e quantitative delle proprietà metaboliche in vitro/in vivo da una specie all'altra). I risultati dell'autopsia macroscopica e della pesatura degli organi vanno valutati, quando possibile, in rapporto alle osservazioni fatte in altri studi a dose ripetuta. I rallentamenti nella crescita della progenie potrebbero essere imputati a un'influenza della sostanza in esame sulla composizione del latte e valutati in quest'ottica (29).

Coorte 2 (neurotossicità nella fase dello sviluppo)

82. I risultati delle valutazioni neurocomportamentali e neuropatologiche vanno interpretati nel contesto di tutti i reperti, utilizzando un metodo basato sulla forza probante dei dati, avvalorati dal parere di esperti. Si dovranno discutere gli eventuali tipi di effetti comportamentali o morfologici riscontrati, così come le prove della relazione dose-risposta. Questa caratterizzazione include la valutazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo, in particolare studi epidemiologici sull'uomo o rapporti di studi di casi e studi su animali sperimentali (ad esempio, dati tossicocinetici, informazioni sulla relazione struttura-attività, i dati ottenuti da altri studi di tossicità). La valutazione dei dati include una discussione della significatività biologica e statistica e comprende l'eventuale relazione tra le alterazioni neuropatologiche e comportamentali osservate. Fare riferimento al metodo di prova B.53 (35) e a Tyl *et al.*, 2008 (31) per indicazioni sull'interpretazione dei risultati relativi alla neurotossicità nella fase dello sviluppo.

Coorte 3 (immunotossicità nella fase dello sviluppo)

83. La soppressione o la stimolazione della funzione immunitaria, valutate dalla prova di risposta anticorpale T-dipendente (TDAR), viene interpretata alla luce dell'insieme delle osservazioni effettuate. La rilevanza dell'esito di questa prova si potrà convalidare in presenza di altri effetti sugli indicatori associati ai fattori immunologici (ad esempio, cellularità del midollo osseo, peso e istopatologia dei tessuti linfoidei, distribuzione delle sottopopolazioni linfoitarie). È possibile che gli effetti evidenziati dalla prova di risposta anticorpale T-dipendente siano meno significativi quando si manifestano altri livelli di tossicità a un'esposizione a concentrazioni più basse.
84. Si consulti il documento d'orientamento dell'OCSE n. 43 (26) per indicazioni sull'interpretazione dei risultati in merito alla riproduzione e alla neurotossicità.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), "A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment", *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), "Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets", *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.
- (3) Zoetis, T. e I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls e T. Zoetis (2005), "Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group", *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), "Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment", *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), "Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey", *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann e B. Orthen (2003), "Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.
- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara e Y. Ohno (2000). "Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies", *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), "Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology", *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), "The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies", *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), "Cycles and Seasons", in C.R. Auston e R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi e R.I. Weiner (1977), "Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat", *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), "Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing", *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), "Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation", *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), "A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat", *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), "Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats", *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray e J.D. Suarez (1991), "The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat". *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), "Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report", *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell e S. Schrader (1992), "Methods for Assessing Rat Sperm Motility", *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts e J.D. Suarez (1992), "Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration", *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), "Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations", *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.
 - (23) Slott, V.L., e S.D. Perreault (1993), "Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer", *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida, pagg. 319-333.
 - (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick e M.K. Smith (1989), "The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations", *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
 - (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott e J.D. Suarez (1992), "Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants", *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
 - (26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
 - (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), "Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility", *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
 - (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), "A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today", *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
 - (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, e R. Duffard (2006), "Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components", *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
 - (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), "Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats", *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
 - (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), "Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints", *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
 - (32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
 - (33) Capitolo B.43 del presente allegato, Studi di neurotossicità nei roditori
 - (34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
 - (35) Capitolo B.53 del presente allegato, Studio della neurotossicità nella fase dello sviluppo
 - (36) Capitolo B.54 del presente allegato, Saggio uterotropico sui roditori: prova di screening a breve termine delle proprietà estrogeniche
 - (37) Capitolo B.55 del presente allegato, Saggio di Hershberger sul ratto: saggio di screening a breve termine delle proprietà (anti)androgeniche
 - (38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
 - (39) OECD (2011), *Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada*, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
 - (40) OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.
-

Appendice 1

Misure e osservazioni incluse nella serie di osservazioni funzionali (coorte 2A)

Stabulazione & campo aperto	Manipolazione	Fisiologia
Postura	Facilità di rimozione	Temperatura
Contrazioni muscolari involontarie toniche e cloniche	Facilità di manipolazione	Peso corporeo
Chiusura delle palpebre	Tono muscolare	Riflesso pupillare
Piloerezione	Risposta all'approccio	Ampiezza pupillare
Salivazione	Risposta al tatto	
Lacrimazione	Risposta auditiva	
Vocalizzazione	Risposta al pizzicamento della coda	
Impennata	Riflesso di raddrizzamento	
Andatura anormale	Divaricazione della zampa all'appoggio	
Eccitazione	Forza di prensione degli arti anteriori	
Stereotipia	Forza di prensione degli arti posteriori	
Comportamento insolito		
Macchie		
Respirazione anormale		

Appendice 2

DEFINIZIONI

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

B.57. SAGGIO DI STEROIDOGENESI SU H295R

INTRODUZIONE

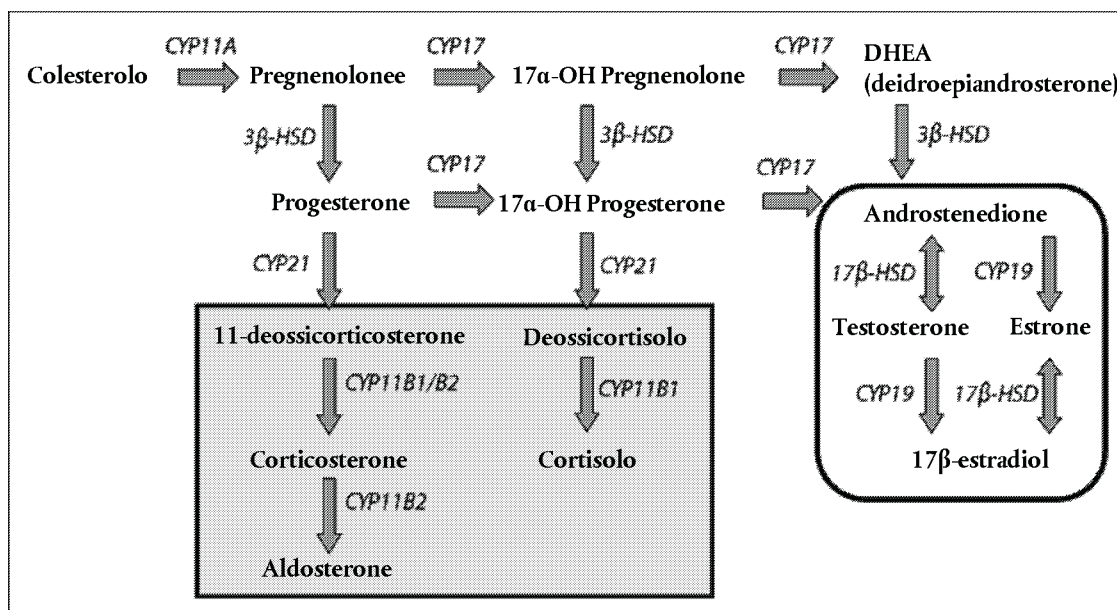
1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 456 (2011). Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario destinati a rivedere le linee guida esistenti e a elaborarne di nuove per lo screening e le prove delle sostanze ritenute potenziali interferenti endocrini (1). Il quadro concettuale dell'OCSE del 2002 riguardante la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino comprende cinque livelli, ciascuno corrispondente a un diverso grado di complessità biologica (1). Il saggio di steroidogenesi *in vitro* su H295R(H295R) descritto nel presente metodo di prova utilizza una linea cellulare umana allestita partendo da un carcinoma surrenalico (cellule NCI-H295R) e costituisce un "saggio in vitro che fornisce dati meccanicistici" di livello 2, da utilizzare a fini di screening e di prioritizzazione. Lo sviluppo e la normalizzazione del saggio in quanto mezzo per individuare gli effetti dei prodotti chimici sulla steroidogenesi, in particolare sulla produzione di 17-β-estradiolo (E2) e di testosterone (T), sono stati realizzati in varie fasi. Il saggio su H295R è stato ottimizzato e validato (2) (3) (4) (5).
2. L'obiettivo del saggio di steroidogenesi su H295R è individuare le sostanze chimiche che incidono sulla produzione di E2 e T. Il saggio su H295R intende identificare gli xenobiotici il cui sito o siti bersaglio sono le componenti endogene che costituiscono la via biochimica intracellulare che porta, attraverso una serie di reazioni, dal colesterolo alla produzione di E2 e/o T. Il saggio su H295R non è inteso a individuare le sostanze chimiche che condizionano la steroidogenesi a causa di effetti sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG). Il saggio si propone di fornire una risposta di tipo SI/NO riguardo al potenziale di una sostanza chimica di indurre o inibire la produzione di E2 e T; tuttavia, è possibile in alcuni casi ottenere risultati quantitativi (cfr. paragrafi 53 e 54). I risultati sono espressi come variazioni relative nella produzione di ormoni rispetto ai controlli con solvente (CS). Il saggio non mira a fornire informazioni meccanicistiche specifiche per quanto riguarda l'interazione tra la sostanza in esame e il sistema endocrino. Sono state effettuate ricerche utilizzando la linea cellulare per individuare gli effetti su enzimi e ormoni intermedi specifici, come il progesterone (2).
3. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nel presente metodo di prova sono descritte nell'appendice. Il protocollo dettagliato sulla preparazione delle soluzioni, la coltura delle cellule e lo svolgimento di vari aspetti della prova è disponibile nelle appendici I, II e III del documento dell'OCSE *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production* (4).

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. Nella biosintesi degli ormoni sessuali steroidei sono coinvolti cinque enzimi diversi che catalizzano sei reazioni diverse. La conversione enzimatica del colesterolo in pregnenolone attraverso l'enzima di scissione della catena laterale del colesterolo (CYP11A) legato al citocromo P450 (CYP) costituisce la tappa iniziale di una serie di reazioni biochimiche che sfociano nella sintesi degli ormoni sessuali steroidei finali. A seconda dell'ordine in cui avvengono le successive due reazioni, la steroidogenesi si suddivide in due processi, uno segue la via Δ⁵-idrossisteroide e l'altro la via Δ⁴-chetosteroide, che convergono nella produzione di androstenedione (figura 1).
5. L'androstenedione viene convertito in testosterone (T) dalla 17β-idrossisteroide deidrogenasi (17β-HSD). Il testosterone è contemporaneamente un ormone intermedio e un ormone finale. Nei maschi, il T può essere convertito in diidrotestosterone (DHT) attraverso la 5α-reduttasi, che si trova nelle membrane cellulari, nell'involucro nucleare e nel reticolo endoplasmatico dei tessuti bersaglio dell'attività androgenica, come prostata e vescicole seminali. Il DHT è considerevolmente più potente del T e viene considerato anche un ormone finale. Il saggio su H295R non misura il DHT (cfr. paragrafo 10).
6. L'enzima della via steroidogenica che converte le sostanze androgeniche in sostanze estrogeniche è l'aromatasi (CYP19). La CYP19 converte il T in 17β-estradiolo (E2) e l'androstenedione in estrone. L'E2 e il T sono considerati ormoni finali della via steroidogenica.
7. Per i substrati intermedi, la specificità dell'attività di liasi del CYP17 è diversa tra le specie. Nell'uomo, l'enzima favorisce i substrati della via Δ⁵-idrossisteroide (pregnenolone), mentre i substrati della via Δ⁴-chetosteroide (progesterone) sono favoriti nel ratto (19). Queste differenze nell'attività di liasi del CYP17 riescono forse a spiegare alcune differenze tra specie nella risposta alle sostanze chimiche che alterano la steroidogenesi in vivo (6). È stato dimostrato che le cellule H295 riflettono con maggiore fedeltà l'espressione dell'enzima surrenalico nell'uomo adulto e lo schema di produzione degli steroidi (20), ma si sa che esprimono gli enzimi delle vie Δ⁵-idrossisteroide e Δ⁴-chetosteroide per la sintesi degli androgeni (7) (11) (13) (15).

Figura 1

Via steroidogenica nelle cellule H295R



Nota:

Gli enzimi sono in corsivo, gli ormoni in grassetto, le frecce indicano la direzione della sintesi. Lo sfondo grigio indica le vie/i prodotti della categoria dei corticosteroidi. Le vie o i prodotti degli steroidi sessuali sono cerchiati. CYP = citocromo P450; HSD = idrossisteroide deidrogenasi; DHEA = deidroepiandrosterone.

8. La linea cellulare umana H295R, derivata da un carcinoma surrenalico, rappresenta un utile modello in vitro per l'indagine degli effetti sulla sintesi degli ormoni steroidei (2) (7) (8) (9) (10). La linea cellulare H295R esprime geni che codificano per tutti i principali enzimi per la steroidogenesi indicati sopra (11) (15) (figura 1). Si tratta di una caratteristica unica, in quanto l'espressione in vivo di questi geni dipende dallo stadio di sviluppo e dai tessuti; in genere, l'espressione di tutti i geni coinvolti nella steroidogenesi non avviene in un singolo tessuto o in un singolo stadio di sviluppo ma in diversi (2). Le cellule H295R hanno le caratteristiche fisiologiche delle cellule surrenaliche fetali umane zonalmente indifferenziate (11). Le cellule rappresentano un sistema in vitro unico, in quanto sono in grado di produrre tutti gli ormoni steroidei che si trovano nella corteccia surrenalica adulta e nelle gonadi che consentono di esaminare gli effetti sia sulla sintesi dei corticosteroidi sia sulla produzione degli ormoni sessuali steroidei quali gli androgeni e gli estrogeni, anche se il saggio è stato convalidato solo per rilevare T e E2. I cambiamenti registrati dal sistema sperimentale sotto forma di alterazioni nella produzione di T ed E2, possono essere il risultato di moltissime interazioni diverse tra le sostanze chimiche in esame e le funzioni steroidogeniche espresse dalle cellule H295R. Esse includono la modulazione dell'espressione, della sintesi o della funzione degli enzimi coinvolti nella produzione, trasformazione o eliminazione degli ormoni steroidei (12) (13) (14). L'inibizione della produzione di ormoni può essere dovuta a un legame competitivo diretto con un enzima nella via di sintesi, all'impatto su cofattori quali il NADPH (nicotinamideadeninucleotide fosfato) e il cAMP (adenosinmonofosfato ciclico) e/o a un'accelerazione del metabolismo degli steroidi o alla soppressione dell'espressione genica di taluni enzimi nella via steroidogenica. Mentre l'inibizione può dipendere dai processi, sia diretti sia indiretti, coinvolti nella produzione di ormoni, l'induzione agisce invece tipicamente in maniera indiretta, ad esempio incidendo su cofattori quali il NADPH e il cAMP (come nel caso della forskolina), rallentando il metabolismo degli steroidi (13) e/o regolando positivamente (*up-regulation*) l'espressione dei geni steroidogenici.

9. Il saggio su H295R presenta molti vantaggi:

- consente di rilevare sia aumento che diminuzione della produzione di T e E2;
- permette di verificare direttamente il potenziale impatto di una sostanza chimica sulla citotossicità/vitalità cellulare. Si tratta di una caratteristica importante, poiché consente di discriminare tra gli effetti dovuti alla citotossicità e quelli dovuti all'interazione diretta delle sostanze chimiche con le vie steroidogeniche, cosa che non è possibile fare nei sistemi a espianto tissutale costituiti da diversi tipi di cellule di sensibilità e funzionalità variabile;

- non comporta l'uso di animali;
- la linea cellulare H295R è reperibile in commercio.

10. I limiti principali del saggio sono i seguenti:

- la sua capacità metabolica non è conosciuta, ma è probabilmente abbastanza limitata; di conseguenza il saggio non è in grado di rilevare le sostanze chimiche che devono essere attivate metabolicamente;
- in quanto derivata da tessuti surrenalici, la H295R possiede enzimi in grado di produrre sia gli ormoni corticoidi minerali e glucocorticoidi sia quelli sessuali; pertanto, gli effetti sulla produzione di corticoidi minerali e glucocorticoidi possono influenzare i livelli di T e E2 osservati nel saggio;
- il saggio non misura il DHT e non permette quindi di rilevare le sostanze che inibiscono la 5 α -reduttasi, per le quali si può utilizzare il saggio di Hershberger (16);
- il saggio su H295R non individua le sostanze chimiche che interferiscono con la steroidogenesi incidendo sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG), interferenza che è possibile studiare solo su animali che presentano un asse HPG intatto.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

11. Scopo del saggio è l'individuazione delle sostanze chimiche che incidono sulla produzione di T e E2. Il T è anche un intermedio nella via di produzione di E2. Il saggio può individuare le sostanze chimiche che generalmente inibiscono o stimolano gli enzimi della via della steroidogenesi.
12. Il saggio è generalmente allestito in condizioni di coltura cellulare standard con piastre a 24 pozzetti; si possono utilizzare anche piastre di altre dimensioni; in questo caso, però, le condizioni di semina e quelle sperimentali vanno adeguate di conseguenza per mantenere la conformità con i criteri di prestazione.
13. Dopo un periodo di acclimatazione di 24 h in piastre multipozzetto, le cellule vengono esposte per 48 h a sette concentrazioni della sostanza in esame, almeno in triplicato. Vengono utilizzati, a una concentrazione fissa, come controlli negativi e positivi, il solvente, un inibitore e un induttore conosciuti della produzione di ormoni. Al termine del periodo di esposizione, il terreno è rimosso da ogni pozzetto. La vitalità cellulare in ciascun pozzetto è analizzata immediatamente dopo la rimozione del terreno. La concentrazione di ormoni nel terreno può essere misurata con diversi metodi, ad esempio i kit per la misura degli ormoni disponibili in commercio e/o le tecniche strumentali come la cromatografia in fase liquida/spettrometria di massa (LC-MS). I dati sono espressi sotto forma di LOEC e di fattore moltiplicativo (*fold change*) rispetto al controllo con solvente. Se il saggio è negativo, la più elevata concentrazione sperimentata viene registrata come NOEC. Le conclusioni circa la capacità di una sostanza chimica di influire sulla steroidogenesi devono basarsi su almeno due corse indipendenti del saggio. La prima può servire a definire il range delle concentrazioni, con un aggiustamento ulteriore delle concentrazioni nella seconda e terza corsa, se necessario, se si riscontrano problemi di solubilità o citotossicità o se l'attività della sostanza chimica sembra situarsi alla fine del range delle concentrazioni testate.

PROTOCOLLO DI COLTURA

Linea cellulare

14. Le cellule NCI-H295R sono disponibili in commercio presso l'*American Type Culture Collections* (ATCC) previa sottoscrizione di un accordo sul trasferimento di materiale (*Material Transfer Agreement*, MTA) ⁽¹⁾.

Introduzione

15. Dato che la capacità di produzione di E2 delle cellule varia in rapporto all'età/ai passaggi in coltura (2), occorre coltivare le cellule secondo un protocollo specifico prima di poterle utilizzare; è necessario registrare il numero dei passaggi dal momento dello scongelamento delle cellule, nonché il numero del passaggio nel quale avviene il congelamento e la conservazione delle cellule in azoto liquido. Il primo numero indicherà l'effettivo numero di passaggi ai quali le cellule sono state sottoposte mentre il secondo identifica il numero del passaggio nel quale le cellule sono state congelate e conservate. Ad esempio, le cellule che sono state congelate dopo il passaggio numero 5, per essere poi scongelate e separate tre volte (4 passaggi, contando le cellule appena scongelate come "passaggio 1"), dopo la nuova coltivazione saranno etichettate con il numero di passaggio 4.5. Un esempio di sistema di numerazione è contenuto nell'appendice I della relazione di validazione (4).
16. La soluzione madre viene utilizzata come base per il terreno supplementato e per il terreno di congelamento. Il terreno supplementato è un componente necessario per la coltura delle cellule. Il terreno di congelamento è specificamente formulato per consentire il congelamento senza impatto sulle cellule, per una conservazione prolungata.

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

Prima dell'uso, il Nu-serum [o un siero equiparabile a parità di proprietà e di cui è comprovata la capacità di produrre dati che soddisfano i requisiti per l'esecuzione del saggio e per il controllo della qualità (CQ)], che è un componente del terreno supplementato, va analizzato per ricercarvi le concentrazioni di fondo di T e E2. La preparazione delle soluzioni citate è descritta nell'appendice II della relazione di validazione (4).

17. Dopo l'iniziazione di una coltura cellulare H295R da un lotto originale di cellule ATCC, occorre coltivare le cellule per cinque passaggi (vale a dire, le cellule vengono separate quattro volte). Le cellule del passaggio 5 vengono poi congelate in azoto liquido, per conservarle. Prima di congelare le cellule occorre testarne un campione del precedente passaggio 4 su una piastra CQ (cfr. paragrafi 36 e 37) per verificare se la produzione basale di ormoni e la risposta alle sostanze di controllo positive soddisfano i criteri CQ del saggio, indicati nella tabella 5.
18. Le cellule H295R devono essere coltivate, congelate e conservate in azoto liquido, per garantire di avere sempre a disposizione cellule da coltivare e utilizzare appartenenti al passaggio o all'età idonei. Dopo la messa in coltura di un lotto di cellule nuovo ⁽¹⁾ o congelato ⁽²⁾, il numero massimo di passaggi accettabile per il saggio su H295R non deve superare i 10. Ad esempio, per le colture di cellule a partire da un lotto congelato al passaggio 5, si andrà da 4.5 a 10.5. Per la preparazione delle cellule a partire dai lotti congelati, si applica il protocollo descritto al paragrafo 19. Queste cellule vengono coltivate per almeno quattro (4) passaggi supplementari (passaggio 4.5) prima di essere utilizzate nelle prove.

Preparazione delle cellule da soluzione congelata

19. Il protocollo per la preparazione delle cellule a partire da una soluzione congelata va utilizzato quando un nuovo lotto di cellule viene rimosso dall'azoto liquido, dove era conservato, al fine di coltivarlo e analizzarlo. I dettagli di questo protocollo sono illustrati nell'appendice III della relazione di validazione (4). Le cellule sono rimosse dall'azoto liquido dove erano conservate, scongelate rapidamente, collocate in un terreno supplementato in una provetta da centrifuga, centrifugate a temperatura ambiente, risospese in terreno supplementato e trasferite in una fiasca di coltura. Il terreno va cambiato il giorno successivo. Le cellule H295R sono coltivate in incubatore a 37 °C in atmosfera al 5 % di CO₂ e il terreno va rinnovato 2-3 volte alla settimana. Quando le cellule hanno raggiunto una confluenza di circa l'85-90 %, vanno divise. La divisione è necessaria per garantire la salute e la crescita delle cellule e preservarle per eseguire ulteriori saggi. Le cellule vengono risciacquate tre volte con soluzione salina tampone fosfato (PBS, senza Ca²⁺ Mg²⁺) e staccate dalla fiasca di coltura tramite aggiunta di un enzima appropriato, ad esempio tripsina, nel PBS (senza Ca²⁺ Mg²⁺). Subito dopo il distacco delle cellule dalla fiasca di coltura, si interrompe l'azione enzimatica aggiungendo un volume di terreno supplementato tre volte superiore al volume del trattamento enzimatico utilizzato. Mettere le cellule in una provetta da centrifuga, centrifugarle a temperatura ambiente, rimuovere il surnatante e risospendere il pellet di cellule in terreno supplementato. Collocare una quantità adeguata di soluzione di cellule nella nuova fiasca di coltura. La quantità di soluzione di cellule va regolata in modo che le cellule siano confluenti entro 5-7 giorni. Il rapporto raccomandato per la subcultura va da 1:3 a 1:4. Occorre poi etichettare accuratamente la piastra. Le cellule sono ora pronte per essere utilizzate per il saggio; quelle in eccesso vanno congelate in azoto liquido come descritto nel paragrafo 20.

Congelamento di cellule H295R (preparazione delle cellule per la conservazione in azoto liquido)

20. Per preparare le cellule H295R per il congelamento occorre seguire il protocollo descritto sopra per la divisione delle cellule, fino alla fase di risospensione del pellet di cellule presenti sul fondo della provetta da centrifuga. Il pellet viene allora risospeso in terreno di congelamento. La soluzione viene trasferita in una provetta criogenica, etichettata adeguatamente, è congelata a - 80 °C per 24 ore e successivamente trasferita in azoto liquido per conservarla. I dettagli di questo protocollo sono illustrati nell'appendice III della relazione di validazione (4).

Piastratura e preincubazione di cellule per le prove

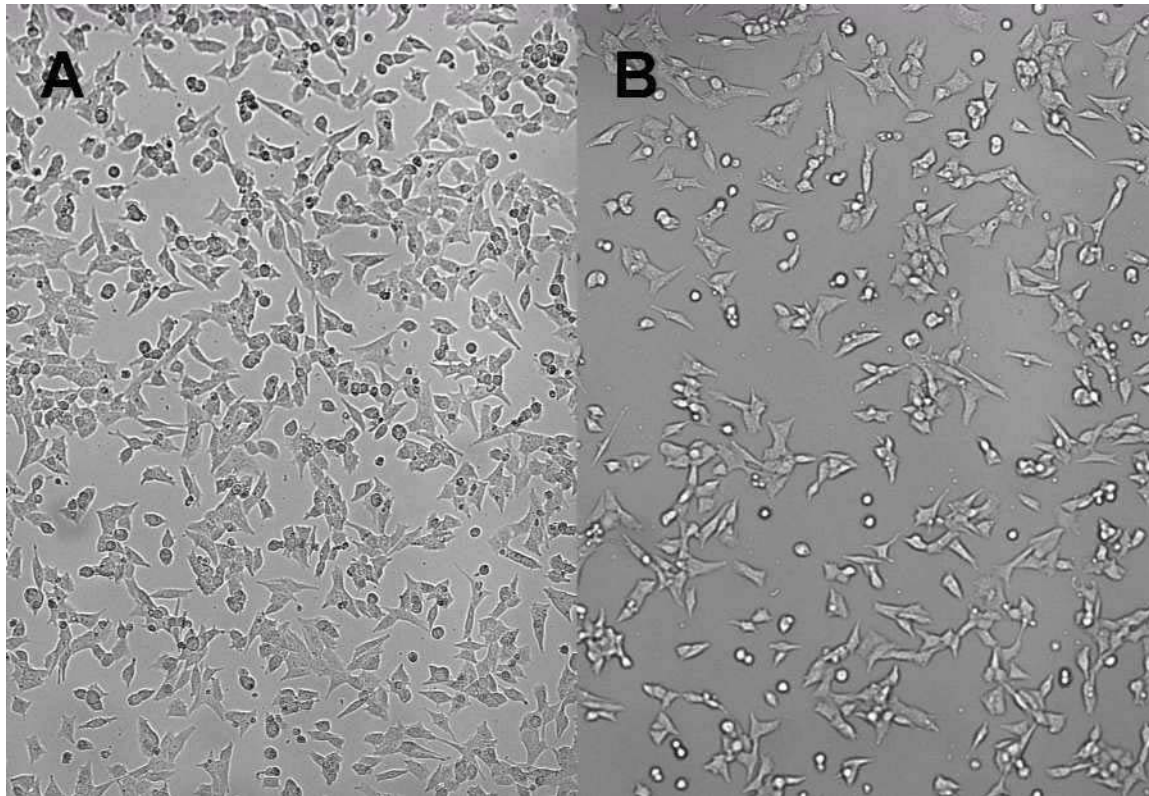
21. Il numero di piastre a 24 pozzetti, preparate come indicato al paragrafo 19, dipende dal numero di sostanze chimiche da sottoporre a prova e dalla confluenza delle cellule nelle piastre di coltura. In generale, una fiasca di coltura (75 cm²) con cellule confluenti all'80-90 % fornirà cellule sufficienti per 1 o 1,5 piastre (a 24 pozzetti) con una densità ottimale compresa tra 200 000 e 300 000 cellule per ml di terreno, risultante in una confluenza del 50-60 % nei pozzetti a 24 ore (figura 2). Questa è la densità ottimale per la produzione di ormoni nel saggio. A densità superiori, i modelli di produzione di T e di E2 risultano alterati. Prima di eseguire il saggio per la prima volta, si raccomanda di saggiare diverse densità tra 200 000 e 300 000 per ml e di scegliere, per le prove sperimentali successive, la densità che produce una confluenza del 50-60 % nei pozzetti a 24 ore.

⁽¹⁾ "Nuovo lotto" si riferisce a un nuovo lotto di cellule proveniente da ATCC.

⁽²⁾ "Lotto congelato" si riferisce a cellule precedentemente coltivate e quindi congelate presso un laboratorio diverso da ATCC.

Figura 2

Fotomicrografia di cellule H295R a densità di semina del 50 % in una piastra a 24 pozzetti a 24 ore, presa al bordo (A) e al centro (B) di un pozzetto



22. Il terreno è pipettato dalla fiasca di coltura e le cellule vengono risciacquate 3 volte con PBS sterile (senza Ca^{2+} e Mg^{2+}). Aggiungere una soluzione enzimatica (nella PBS) per staccare le cellule dalla fiasca di coltura. Dopo aver dato tempo alle cellule di staccarsi, interrompere l'azione dell'enzima aggiungendo un volume di terreno supplementato tre volte superiore al volume della soluzione enzimatica utilizzata. Mettere le cellule in una provetta da centrifuga, centrifugarle a temperatura ambiente, rimuovere il surnatante e risospendere il pellet di cellule in terreno supplementato. Calcolare la densità delle cellule utilizzando, ad esempio, un emocitometro o un contacellule. Diluire la soluzione cellulare fino a raggiungere la densità desiderata per la placcatura e miscelare accuratamente per garantire una densità omogenea delle cellule. Piastrare le cellule utilizzando 1 ml di soluzione di cellule/pozzetto ed etichettare accuratamente le piastre e i pozzetti. Incubare le piastre seminate a 37 °C per 24 ore in atmosfera al 5 % di CO_2 , per consentire alle cellule di aderire ai pozzetti.

REQUISITI PER IL CONTROLLO DI QUALITÀ (CQ)

23. È fondamentale immettere nei pozzetti il volume esatto di soluzioni e campioni durante il dosaggio, perché questi volumi determinano le concentrazioni utilizzate nel calcolo dei risultati del saggio.
24. Prima di avviare la coltura cellulare e di svolgere qualunque prova, ciascun laboratorio deve dimostrare la sensibilità del suo sistema di misura degli ormoni (paragrafi 29-31).
25. Se si prevede di svolgere prove di misura degli ormoni utilizzando anticorpi, prima di procedere agli esperimenti è necessario analizzare le sostanze in esame per verificarne il potenziale di interferenza con il sistema di misura utilizzato per quantificare T e E2, come indicato al paragrafo 32.

26. Il solvente raccomandato per il saggio è il DMSO. Se si utilizza un altro solvente è necessario determinare quanto segue:
- la solubilità della sostanza chimica di prova, della forscolina e del procloraz nel solvente; e
 - la citotossicità in funzione della concentrazione del solvente.
- Si raccomanda che la concentrazione massima consentita del solvente non superi una diluzione pari a $10\times$ la sua concentrazione citotossica più bassa.
27. Prima di effettuare gli esperimenti per la prima volta, il laboratorio deve condurre una prova di idoneità per dimostrare che è in grado di mantenere e ottenere le colture cellulari nelle condizioni sperimentali adeguate allo svolgimento delle prove sulle sostanze chimiche descritte nei paragrafi da 33 a 35.
28. Prima di utilizzarle per un esperimento, occorre eseguire una prova su una piastra di controllo con ogni nuovo lotto di cellule per valutarne il rendimento, come descritto ai paragrafi 36 e 37.

Prestazioni del sistema di misura degli ormoni

Sensibilità, accuratezza, precisione e reattività incrociata con la matrice del campione

29. Ogni laboratorio può scegliere il sistema di misura degli ormoni da utilizzare per l'analisi della produzione di T e E2 da cellule H295R, a condizione che soddisfi i criteri di prestazione, incluso il limite di quantizzazione (LOQ). In principio, il limite è di 100 pg/ml per il T e di 10 pg/ml per l'E2, sulla base dei livelli basali degli ormoni osservati negli studi di validazione. Tuttavia, possono essere necessari livelli più alti o più bassi in funzione dei livelli basali raggiunti nel laboratorio che esegue la prova. Prima di saggiare le piastre CQ e svolgere corse sperimentali, il laboratorio deve dimostrare, mediante l'analisi del terreno supplementato addizionato con un ormone interno di controllo, che il saggio sugli ormoni che prevede di utilizzare sia in grado di misurare le concentrazioni di ormoni nel terreno supplementato con sufficiente accuratezza e precisione da soddisfare i criteri CQ indicati nelle tabelle 1 e 5. Il terreno supplementato va addizionato con almeno tre concentrazioni di ciascun ormone e in seguito va analizzato (esempi di concentrazione: 100, 500 e 2 500 pg/ml di T; 10, 50 e 250 pg/ml di E2; oppure si possono usare le concentrazioni più basse possibili sulla base del limite di rivelazione per il sistema di misura per l'ormone scelto per i picchi di concentrazione per T e E2). Le concentrazioni ormonali misurate dei campioni non estratti non devono scostarsi di più del 30 % dalle concentrazioni nominali, e le variazioni tra le misure replicate sullo stesso campione non devono superare il 25 % (cfr. anche tabella 8, per ulteriori criteri CQ). Se questi criteri CQ sono soddisfatti, si suppone che il saggio di misura degli ormoni prescelti sia sufficientemente accurato, preciso e privo di reazioni incrociate con componenti del terreno (matrice del campione) tali da far prevedere un impatto significativo sui risultati dell'analisi. In tal caso, non è richiesta l'estrazione di campioni prima della misura degli ormoni.
30. Nel caso in cui i criteri CQ riportati nelle tabelle 1 e 8 non siano soddisfatti potrebbe verificarsi un significativo effetto matrice, nel qual caso occorre svolgere un esperimento procedendo a un'estrazione sul terreno addizionato. Un esempio di procedura di estrazione è contenuto nell'appendice II della relazione di validazione (4). Le misure delle concentrazioni di ormoni presenti nei campioni estratti vanno svolte in triplicato (¹). Se è possibile dimostrare che dopo l'estrazione, conformemente ai criteri CQ, i componenti del terreno di coltura non interferiscono con il metodo di rilevazione degli ormoni, tutti gli ulteriori esperimenti saranno svolti utilizzando campioni estratti. Se i criteri CQ non sono soddisfatti dopo l'estrazione, ciò significa che il sistema di misura degli ormoni utilizzato non è adeguato ai fini del saggio di steroidogenesi su H295R e che sarà necessario utilizzarne uno diverso.

Curva standard

31. Le concentrazioni di ormoni dei controlli con solvente (CS) devono situarsi nella parte lineare della curva standard. È preferibile che i valori CS risultino in prossimità del centro della parte lineare, per garantire che sia possibile misurare l'inibizione o l'induzione della sintesi degli ormoni. Le diluizioni del terreno (o degli estratti) da misurare vanno selezionate di conseguenza. La relazione lineare viene determinata mediante un metodo statistico adeguato.

Prova sull'interferenza delle sostanze chimiche

32. Se per misurare gli ormoni si prevede di svolgere saggi a base di anticorpi, come i test immunoenzimatici (ELISA) o radioimmunologici (RIA), è necessario verificare la potenziale interferenza di ogni sostanza chimica con il sistema di misura degli ormoni che sarà utilizzato, prima ancora di avviare i saggi sulle sostanze chimiche stesse [appendice III della relazione di validazione (4)], perché alcune di queste possono interferire con i suddetti test (17). Se si verifica un'interferenza ≥ 20 % della produzione basale di ormoni per il T o l'E2, determinata dall'analisi degli ormoni, è necessario svolgere il "Test di interferenza delle sostanze chimiche con la misura degli ormoni" [descritto nell'appendice III, sezione 5.0, della relazione di validazione (4)] su tutte le diluizioni della soluzione

(¹) Nota : Se è richiesta l'estrazione, su ogni estratto vanno condotte tre misure replicate. Ogni campione viene estratto una sola volta.

madre delle sostanze in esame per determinare la dose soglia a partire dalla quale si verifica un'interferenza di rilievo (cioè $\geq 20\%$). Se l'interferenza è inferiore al 30 % i risultati possono essere corretti di conseguenza. Se l'interferenza è superiore al 30 % i dati non sono da considerarsi validi e, relativamente a queste concentrazioni, sono scartati. Se si verifica un'interferenza significativa di una sostanza chimica in esame con il sistema di misura degli ormoni a diverse concentrazioni non citotossiche, è necessario utilizzare un sistema di misura diverso. Al fine di evitare interferenze causate da sostanze chimiche contaminanti si raccomanda di estrarre dal terreno gli ormoni utilizzando un solvente apposito; dei metodi a questo fine sono illustrati nella relazione di validazione (4).

Tabella 1

Criteri di prestazione dei sistemi per la misura degli ormoni

Parametro	Criterio
Sensibilità del metodo di misura	Limite di quantizzazione (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Efficienza nell'estrazione degli ormoni (solo nel caso in cui l'estrazione sia necessaria)	I tassi medi di recupero (sulla base delle misure in triplicato) delle quantità di ormoni addizionati non mostrano uno scarto superiore al 30 % rispetto alla quantità addizionata.
Interferenza della sostanza chimica (solo per i sistemi a base di anticorpi)	Non deve verificarsi una reattività incrociata significativa ($\geq 30\%$ della produzione basale di ormoni, per l'ormone considerato) con nessuno degli ormoni prodotti dalle cellule ^(b) ^(c) .

(a) Nota: i limiti del metodo di misura si fondano sulla produzione basale di ormoni, illustrata alla tabella 5, e si basano sulle prestazioni. Se la produzione basale di ormoni aumenta, anche il limite può aumentare.

(b) A percentuali più elevate alcuni anticorpi del T e dell'E2 possono produrre una reazione incrociata con, rispettivamente, l'androstenedione e l'estrone. In questi casi non è possibile determinare con esattezza gli effetti sulla 17 β -HSD. Tuttavia, i dati possono ancora fornire informazioni utili a proposito degli effetti sulla produzione di estrogeni o di androgeni in generale. In questi casi, i dati dovrebbero essere espressi come risposta androgenica/estrogenica anziché relativa al T e all'E2.

(c) Vale a dire: colesterolo, pregnenolone, progesterone, 11-desossicorticosterone, corticosterone, aldosterone, 17 α -pregnenolone, 17 α -progesterone, deossicortisolo, cortisolo, DHEA (deidroepiandrosterone), androstenedione, estrone.

Test d'idoneità del laboratorio

33. Prima di svolgere prove su sostanze chimiche sconosciute, un laboratorio deve svolgere un test d'idoneità per dimostrare di essere in grado di ottenere e mantenere adeguate colture cellulari e condizioni sperimentali, quali quelle richieste per il corretto svolgimento del saggio. Dato che la riuscita di un saggio è strettamente dipendente dal personale di laboratorio che lo esegue, i protocolli del test di idoneità vanno in parte ripetuti in caso di cambiamento di personale.
34. Il test di idoneità sarà svolto nelle stesse condizioni sperimentali descritte ai paragrafi da 38 a 40, esponendo le cellule a 7 concentrazioni in scala crescente di induttori e inibitori — forti, medi e lievi — e a una sostanza chimica negativa (cfr. tabella 2). Più precisamente, come indicato dalla tabella 2, le sostanze chimiche da sottoporre a prova sono: la forskolina (n. CAS 66575-29-9), induttore forte; il procloraz (n. CAS 67747-09-5), inibitore forte; l'atrazina (n. CAS 1912-24-9), induttore moderato; l'aminoglutetimide (n. CAS 125-84-8), inibitore moderato; il bisfenolo A (n. CAS 80-05-7) induttore lieve (produzione di E2) e inibitore lieve (produzione di T); e la gonadotropina corionica umana (HCG) (n. CAS 9002-61-3), sostanza negativa. Vanno testate piastre separate per tutte le sostanze chimiche, secondo il formato illustrato nella tabella 6. Nei test d'idoneità, per ciascuna corsa quotidiana delle prove sulle sostanze chimiche va inclusa una piastra per il controllo CQ (tabella 4, paragrafi 36 e 37)

Tabella 2

Sostanze chimiche per il test d'idoneità e concentrazioni di esposizione

Sostanza chimica	Concentrazioni di prova [μ M]
Procloraz	0 ^(a) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolina	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Sostanza chimica	Concentrazioni di prova [μ M]
Atrazina	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimide	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenolo A	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

^(a) Controllo con solvente (DMSO) (0), 1 μ l DMSO/pozzetto

Durante il test d'idoneità, l'esposizione delle H295R alle sostanze chimiche avviene in piastre a 24 pozzetti. Il dosaggio è in μ M per tutte le dosi della sostanza chimica in esame. Le dosi vanno somministrate nel DMSO a 0,1 % (v/v) per pozzetto. Tutte le concentrazioni di prova devono essere testate nei pozzetti in triplicato (tabella 6). Per ciascuna sostanza chimica si utilizza una piastra distinta. Viene inclusa una piastra di CQ per ogni corsa giornaliera.

35. Occorre svolgere l'analisi di vitalità cellulare e l'analisi ormonale, come indicato nei paragrafi da 42 a 46. Vanno registrati il valore di soglia (LOEC) e le categorie di decisione, confrontandoli con i valori riportati in tabella 3. I dati sono considerati accettabili se conformi alla LOEC e alla decisione di classificazione di cui alla tabella 3.

Tabella 3

LOEC e categorie di decisioni sulla classificazione per le sostanze chimiche del test di idoneità

	N. CAS	LOEC [μ M]		Categoria di decisione	
		T	E2	T	E2
Procloraz	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ ^(a) (inibizione)	+ (inibizione)
Forscolina	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (induzione)	+ (induzione)
Atrazina	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (induzione)	+ (induzione)
Aminoglutetimide	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inibizione)	+ (inibizione)
Bisfenolo A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inibizione)	+ (induzione)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	negativo	negativo

^(a) +, positivo

n/a: non applicabile, in quanto non devono verificarsi modifiche dopo l'esposizione a concentrazioni non citotossiche del controllo negativo.

Piastra per il controllo della qualità (CQ)

36. La piastra CQ viene utilizzata per verificare il rendimento delle cellule H295R in condizioni di coltura standard e per stabilire una serie di dati storici per le concentrazioni di ormoni nei controlli con solvente, nei controlli positivi e negativi, e in altre misure di CQ nel corso del tempo.
- Il rendimento delle cellule H295R va valutato ricorrendo a una piastra CQ per ogni nuovo lotto ATCC o dopo aver utilizzato un lotto di cellule precedentemente congelate per la prima volta, salvo quando il test di idoneità (paragrafi da 32 a 34) è stato svolto utilizzando lo stesso lotto di cellule.
 - Quando le sostanze chimiche sono sottoposte a prova, la piastra CQ fornisce una valutazione completa delle condizioni sperimentali (vitalità cellulare, controlli con solvente, controlli negativi e positivi, nonché variabilità intra- e inter-prova), e deve essere parte integrante di ciascuna corsa.
37. La prova CQ va svolta su una piastra a 24 pozzetti secondo gli stessi protocolli di incubazione, dosaggio, vitalità/tossicità cellulare, estrazione e analisi degli ormoni, descritti nei paragrafi da 38 a 46 per le prove sulle sostanze chimiche. La piastra CQ contiene: bianchi, controlli con solvente e due concentrazioni di un induttore noto

(forskolina, 1, 10 μM) e di un inibitore noto (procloraz, 0,1, 1 μM) della sintesi di E2 e T. Inoltre, in alcuni pozzetti si utilizza il MeOH come controllo positivo per la prova di vitalità/citotossicità. Una descrizione dettagliata della configurazione della piastra è fornita nella tabella 4. I criteri da soddisfare riguardo alla piastra CQ sono elencati in tabella 5. Occorre raggiungere la quantità minima di produzione basale di ormoni per il T e l'E2 sia nei pozzetti del controllo con solvente che in quelli del bianco.

Tabella 4

Configurazione della piastra di controllo per testare il rendimento delle cellule H295R non esposte e delle cellule esposte a inibitori conosciuti (PRO = procloraz) e induttori conosciuti (FOR = forskolina) della produzione di E2 e T. Al termine dell'esposizione e dopo aver rimosso il terreno, aggiungere un soluzione al 70 % di metanolo a tutti i pozzetti con MeOH, che serviranno da controllo positivo per la citotossicità [cfr. la prova di citotossicità nell'appendice III della relazione di validazione (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	bianco ^(a)	bianco ^(a)	bianco ^(a)	bianco ^(a) (+ MeOH) ^(b)	bianco ^(a) (+ MeOH) ^(b)	bianco ^(a) (+ MeOH) ^(b)
B	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

^(a) Le cellule nei pozzetti del bianco ricevono solo terreno (senza solvente).

^(b) Il metanolo (MeOH) viene aggiunto **dopo** che l'esposizione ha avuto termine e il terreno è stato rimosso da questi pozzetti.

^(c) Controllo con solvente DMSO (1 μl /pozzetto).

Tabella 5

Criteri di rendimento per la piastra CQ

	T	E2
Produzione basale di ormoni nel controllo con solvente (CS)	≥ 5 volte il LOQ	$\geq 2,5$ volte il LOQ
Induzione (10 μM forskolina)	$\geq 1,5$ volte il CS	$\geq 7,5$ volte il CS
Inibizione (1 μM procloraz)	$\leq 0,5$ volte il CS	$\leq 0,5$ volte il CS

PROTOCOLLO DELL'ESPOSIZIONE ALLE SOSTANZE CHIMICHE

38. Rimuovere dall'incubatore le cellule preincubate (paragrafo 21) e verificarle al microscopio per assicurarsi che siano in buono stato (adesione, morfologia) prima della somministrazione delle dosi.
39. Collocare le cellule in una cappa di sicurezza biologica e rimuovere il terreno supplementato sostituendolo con terreno supplementato nuovo (1 ml/pozzetto). Il solvente preferito per questo metodo di prova è il DMSO. Se tuttavia sussistono ragioni per utilizzare altri solventi, la scelta va accompagnata da motivazioni scientifiche. Esporre le cellule alla sostanza chimica in esame aggiungendo 1 μl della soluzione madre adeguata nel DMSO [cfr. appendice II della relazione di convalida (4)] per 1 ml di terreno supplementato (volume del pozzetto). Nei

pozzetti risulterà una concentrazione finale dello 0,1 % del DMSO. Per assicurare una congrua miscelazione è generalmente preferibile che la soluzione madre adeguata della sostanza chimica in esame nel DMSO venga mescolata con terreno supplementato così da ottenere la concentrazione finale desiderata per ciascuna dose, e che la miscela venga aggiunta a ciascun pozzetto immediatamente dopo la rimozione del vecchio terreno. Se viene scelta questa modalità, occorre che la concentrazione di DMSO (0,1 %) rimanga costante in tutti i pozzetti. Utilizzando uno stereomicroscopio, esaminare visivamente i pozzetti contenenti le due concentrazioni più alte per rilevare eventuali formazioni di precipitati oppure opacità che indicherebbero una solubilità incompleta della sostanza in esame. In presenza di queste condizioni (opacità, formazione di precipitati) occorre esaminare anche i pozzetti contenenti la concentrazione immediatamente inferiore (e così via) ed escludere da ogni successiva valutazione ed analisi le concentrazioni non completamente disciolte. Rimettere la piastra nell'incubatore a 37 °C per 48 ore in atmosfera al 5 % di CO₂. La configurazione della piastra è descritta nella tabella 6. I campi da "soluzione 1" a "soluzione 7" si riferiscono ai dosaggi scalari crescenti della sostanza in esame.

Tabella 6

Disposizione delle dosi per l'esposizione delle cellule H295R alle sostanze chimiche in esame, in una piastra a 24 pozzetti.

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Soluzione 4	Soluzione 4	Soluzione 4
B	Soluzione 1	Soluzione 1	Soluzione 1	Soluzione 5	Soluzione 5	Soluzione 5
C	Soluzione 2	Soluzione 2	Soluzione 2	Soluzione 6	Soluzione 6	Soluzione 6
D	Soluzione 3	Soluzione 3	Soluzione 3	Soluzione 7	Soluzione 7	Soluzione 7

40. Dopo 48 ore rimuovere la piastra di esposizione dall'incubatore e controllare ogni pozzetto al microscopio verificando le condizioni della cellula (adesione, morfologia, grado di confluenza) e segni di citotossicità. Suddividere il terreno di ogni pozzetto in due parti uguali (circa 490 µl ciascuna) e trasferirle in due fiale adeguatamente etichettate (vale a dire, un'aliquota come campione di riserva per ciascun pozzetto). Per evitare il disseccamento delle cellule, rimuovere il terreno una colonna o una riga per volta, sostituendolo con il terreno per la prova di vitalità cellulare/citotossicità. Se la vitalità/citotossicità non va misurata immediatamente, aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di PBS con Ca²⁺ e Mg²⁺. Congelare il terreno a -80 °C finché sarà necessario procedere a ulteriori analisi delle concentrazioni ormonali (cfr. paragrafi da 44 a 46). Il T e l'E2 sono in genere stabili per almeno tre mesi in un terreno conservato a -80 °C, ma è opportuno che la stabilità degli ormoni durante la conservazione sia documentata in ciascun laboratorio.
41. Immediatamente dopo la rimozione del terreno, determinare la vitalità cellulare/citotossicità per ciascuna piastra di esposizione.

Determinazione della vitalità cellulare

42. Per determinare l'impatto potenziale della sostanza chimica sulla vitalità cellulare è possibile utilizzare qualsiasi saggio di vitalità/citotossicità, che deve essere in grado di fornire la misura reale della percentuale di cellule vitali presenti in un pozzetto; oppure è necessario dimostrare che tale dato è direttamente comparabile con (una funzione lineare de) la prova condotta con un kit Live/Dead® [cfr. appendice III della relazione di validazione (4)]. Un'altra prova che ha dimostrato di funzionare altrettanto bene è il test MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro] (18). La valutazione della vitalità cellulare svolta con i metodi appena citati costituisce una valutazione relativa che non presenta necessariamente una relazione lineare con il numero assoluto di cellule in un pozzetto. Pertanto, l'analista svolge una valutazione visiva soggettiva in parallelo di ciascun pozzetto e scatta foto digitali dei controlli con solvente e delle due maggiori concentrazioni non citotossiche, che verranno archiviate per consentire eventualmente una valutazione successiva della vera densità cellulare, se necessario. Se il controllo visivo o la prova di vitalità/citotossicità suggeriscono un probabile incremento del numero di cellule, questo apparente incremento va verificato. Se l'incremento viene comprovato, è necessario indicarlo nella relazione sulla prova. La vitalità delle cellule viene espressa in rapporto alla risposta media nei controlli con solvente, nei quali si considera che sia pari al 100 %, ed è calcolata nella maniera più consona al tipo di prova di vitalità/citotossicità utilizzato. Per il test MTT, si può utilizzare la seguente formula:

% di vitalità cellulare = [risposta nel pozzetto – risposta media nei pozzetti trattati con MeOH (= 100 % di cellule morte)] – [risposta media nei pozzetti CS – risposta media nei pozzetti trattati con MeOH (= 100 % di cellule morte)]

43. I pozzetti con una vitalità inferiore all'80 % rispetto alla vitalità media nei pozzetti CS (= 100 % di cellule vive), non vanno inclusi nell'analisi finale dei dati. L'inibizione della steroidogenesi che si verifica in presenza di circa il 20 % di citotossicità necessita di essere attentamente esaminata per assicurarsi che la citotossicità non ne sia la causa.

Analisi ormonale

44. Per l'analisi del T e dell'E2, ciascun laboratorio può utilizzare un sistema per la misura degli ormoni di sua scelta. Le aliquote di riserva del terreno di ciascun gruppo di trattamento possono essere utilizzate per preparare diluizioni che portino la concentrazione all'interno della parte lineare della curva standard. Come segnalato al paragrafo 29, ciascun laboratorio deve dimostrare la conformità del suo sistema di misura degli ormoni con i criteri di CQ (utilizzando, ad esempio: ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS), analizzando il terreno supplementato addizionato con gli ormoni di controllo interno. Per assicurarsi che i componenti del sistema sperimentale non interferiscano con la misura degli ormoni, potrebbe essere necessario estrarre gli ormoni dai terreni prima di misurarli (cfr. paragrafo 30 per le condizioni nelle quali un'estrazione è o non è richiesta). Si raccomanda di procedere all'estrazione secondo i protocolli di cui all'appendice III della relazione di validazione (4).
45. Se viene utilizzato un kit reperibile in commercio per misurare la produzione di ormoni, l'analisi ormonale va svolta come specificato nel manuale fornito dal fabbricante del kit. La maggior parte dei fabbricanti indica un'unica procedura per svolgere le analisi ormonali. Le diluizioni dei campioni vanno adeguate in modo che le concentrazioni ormonali per i controlli con solvente si situino al centro dell'intervallo di linearità della curva standard della prova interessata [appendice III della relazione di validazione (4)]. I valori al di fuori dell'intervallo di linearità della curva standard devono essere scartati.
46. Le concentrazioni ormonali finali sono calcolate come segue:

Esempio:

Estratto:	450 µl di terreno
Ricostituito in:	250 µl di tampone
Tenore di diluizione nella prova:	1:10 (per portare il campione nell'intervallo di linearità della curva standard)
Concentrazione ormonale nel saggio:	150 pg/ml (già adeguata alla concentrazione/ml del campione saggiato)
Recupero:	89 %
Concentrazione ormonale finale =	(concentrazione degli ormoni (per ml) ÷ recupero) (fattore di diluizione)
Concentrazione ormonale finale =	$(150 \text{ pg/ml}) \div (0,89) \times (250 \text{ µl}/450 \text{ µl}) \times 10 = 936,3 \text{ pg/ml}$

Selezione delle concentrazioni sperimentali

47. Occorre svolgere come minimo due corse indipendenti della prova. Salvo in presenza di precedenti informazioni che forniscono una base a partire dalla quale scegliere le concentrazioni sperimentali (ad esempio informazioni sui limiti di solubilità o sulla citotossicità), per la corsa iniziale si raccomanda di spaziare le concentrazioni ad intervalli $\log_{10}$ con concentrazione massima di 10^{-3} M. Se la sostanza chimica è solubile e non citotossica a

nessuna delle concentrazioni impiegate, e se la prima corsa è risultata negativa per tutte le concentrazioni, occorre confermare i risultati attraverso una seconda corsa svolta utilizzando le stesse modalità della prima (tabella 7). Se i risultati della prima corsa sono *ambigui* (vale a dire se il fattore moltiplicativo del cambiamento rispetto al controllo con solvente è statisticamente significativo solo per un'unica concentrazione) o *positivi* (vale a dire se il fattore moltiplicativo è statisticamente significativo almeno per due concentrazioni adiacenti), è necessario ripetere la prova come indicato nella tabella 7, perfezionando le concentrazioni sperimentali prescelte. Le concentrazioni allestite per la seconda e terza corsa (se del caso) vanno adeguate sulla base dei risultati della prima, affinando le concentrazioni che hanno generato un effetto utilizzando una scala logaritmica 1/2-log (es.: se la prima corsa con 0,001 — 0,01 — 0,1 — 1 — 10 — 100 — 1 000 µM ha prodotto induzioni a 1 e 10 µM, le concentrazioni testate nella seconda corsa devono utilizzare 0,1 — 0,3 — 1, 3 — 10 — 30 — 100 µM), a meno che non sia necessario utilizzare concentrazioni più basse per determinare la LOEC. In quest'ultimo caso, nella seconda corsa vanno utilizzate almeno cinque concentrazioni inferiori alla concentrazione più bassa saggiata nella prima corsa usando una scala logaritmica 1/2-log. Se la seconda corsa non conferma la prima (ossia, se non si osserva una significatività statistica alla concentrazione già precedentemente saggiata con risultato positivo ± 1 incremento di concentrazione), occorre procedere a una terza corsa che utilizzi le condizioni sperimentali originali. I risultati ambigui della prima corsa sono considerati negativi qualora l'effetto osservato non abbia potuto essere confermato in nessuna delle due ulteriori corse. I risultati ambigui sono considerati risposte positive (effetti) quando una risposta può essere confermata in almeno una corsa successiva con un incremento ± 1 della concentrazione (cfr. paragrafo 55 per il protocollo di interpretazione dei dati).

Tabella 7

Matrice decisionale per possibili scenari di esito

Corsa 1	Corsa 2		Corsa 3		Decisione	
Scenario	Decisione	Scenario	Decisione	Scenario	Positivo	Negativo
Negativo	Confermare ^(a)	Negativo	Stop			X
Negativo	Confermare ^(a)	Positivo	Perfezionare ^(b)	Negativo		X
Ambiguo ^(c)	Perfezionare ^(b)	Negativo	Confermare ^(a)	Negativo		X
Ambiguo ^(c)	Perfezionare ^(b)	Negativo	Confermare ^(a)	Positivo	X	
Ambiguo ^(c)	Perfezionare ^(b)	Positivo			X	
Positivo	Perfezionare ^(b)	Negativo	Confermare ^(a)	Positivo	X	
Negativo	Confermare ^(a)	Positivo	Perfezionare ^(b)	Positivo	X	
Positivo	Perfezionare ^(b)	Positivo	Stop		X	

^(a) Confermare la corsa precedente utilizzando lo stesso disegno sperimentale.

^(b) Prova rieseguita con concentrazioni a intervalli logaritmici 1/2-log (affinando le concentrazioni che sono risultate significativamente diverse nella precedente corsa).

^(c) Il fattore moltiplicativo a una determinata concentrazione è diverso in modo statisticamente significativo rispetto al controllo con solvente.

Controllo di qualità della piastra sperimentale

48. Oltre a rispettare i criteri relativi alla piastra CQ, occorre osservare altri criteri di qualità (descritti nella tabella 8) che attengono alla variazione accettabile tra i pozzetti replicati, le corse replicate, la linearità e sensibilità dei sistemi di misura degli ormoni, la variabilità tra le misure degli ormoni replicate sullo stesso campione, e la percentuale di recupero delle quantità di ormoni addizionate dopo l'estrazione del terreno (se del caso; cfr. il paragrafo 30, relativo ai requisiti per l'estrazione). Per essere presi in considerazione nella valutazione successiva, i dati devono rientrare negli intervalli accettabili definiti per ciascun parametro. Se questi criteri non sono soddisfatti occorre annotare sul foglio elettronico che i criteri CQ non sono stati soddisfatti per il campione in questione, il quale sarà rianalizzato o eliminato dall'insieme dei dati.

Tabella 8

Intervalli e/o variazioni accettabili (%) per i parametri della piastra del saggio su H295R.

LOQ: limite di quantizzazione del sistema di misura degli ormoni; CV: coefficiente di variazione; CS: controllo con solvente; DPM: disintegrazioni per minuto.

	Confronto tra	T	E2
Produzione basale di ormoni nei controlli con solvente.	Fattore moltiplicativo in rapporto al LOQ	≥ 5 volte	$\geq 2,5$ volte
Esperimenti di esposizione — CV intrapiastre per i CS (pozzetti replica)	Concentrazioni assolute	≤ 30 %	≤ 30 %
Esperimenti di esposizione — CV interpiastre per i CS (esperimenti replica)	Fattore moltiplicativo	≤ 30 %	≤ 30 %
Sistema di misura degli ormoni — sensibilità	Fattore di decremento rispetto al CS	≥ 5 volte	$\geq 2,5$ volte
Sistema di misura degli ormoni — CV delle misure replicate per i CS ^(a)	Concentrazioni assolute	≤ 25 %	≤ 25 %
Estrazione del terreno — Recupero dello standard interno 3H (se del caso)	DPM	≥ 65 % del nominale	

^(a) Si riferisce a misure replicate sullo stesso campione.

ANALISI DEI DATI E RELAZIONE

Analisi dei dati

49. Per valutare l'aumento relativo/la riduzione relativa della produzione di ormoni chimicamente alterati, occorre normalizzare i risultati sulla base del valore medio del controllo con solvente di ciascuna piastra ed esprimere i risultati sotto forma di cambiamento rispetto al controllo con solvente in ciascuna piastra. Tutti i dati sono espressi come valore medio ± 1 deviazione standard (SD).
50. Vanno inclusi nell'analisi dei dati solo quelli relativi agli ormoni dei pozzetti dove la citotossicità è attestata al di sotto del 20 %. Le variazioni relative sono calcolate come segue:

Variazione relativa = (concentrazione di ormoni in ciascun pozzetto) $\div$ (concentrazione media di ormoni in tutti i pozzetti di controllo con solvente).

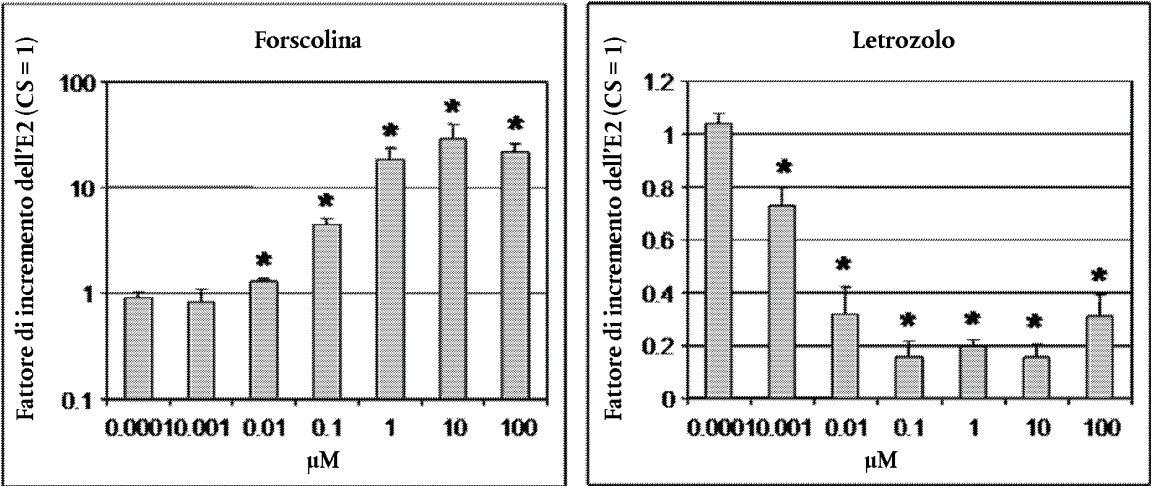
51. Se il controllo visivo del pozzetto o la prova di vitalità/citotossicità descritta al paragrafo 42 suggeriscono un probabile incremento del numero di cellule, questo apparente incremento va verificato. Se l'incremento viene comprovato, è necessario indicarlo nella relazione sulla prova.
52. Prima di condurre analisi statistiche, occorre valutare le ipotesi di normalità e omogeneità delle varianze. La normalità va valutata utilizzando un diagramma della probabilità standard o un altro metodo statistico adeguato (ad esempio il test di Shapiro-Wilk). Se la distribuzione dei dati (fattori moltiplicativi) non segue un andamento normale, si dovrà cercare di trasformare i dati in modo da approssimare una distribuzione normale. Se i dati sono distribuiti normalmente o si approssimano a una distribuzione normale, occorre analizzare le differenze tra i gruppi di concentrazioni della sostanza chimica e i controlli con solvente ricorrendo a un test parametrico (per esempio, il test di Dunnett), dove la *concentrazione* sarà la variabile indipendente e la *risposta* (fattore moltiplicativo) sarà la variabile dipendente. Se i dati non sono distribuiti normalmente, occorre utilizzare un test non parametrico adeguato (ad esempio, il test di Kruskal Wallis o il test di Steel ad uno o più ranghi). Le differenze sono considerate significative a $p \leq 0,05$. Le analisi statistiche vengono svolte sulla base dei valori medi per ciascun pozzetto, che rappresentano repliche indipendenti di dati. A causa degli intervalli importanti tra le dosi nella prima corsa (scala $\log_{10}$), bisogna prevedere che in molti casi non sia possibile descrivere una chiara relazione concentrazione-risposta dove le due dosi più elevate si situano nella parte lineare della curva sigmoide. Di conseguenza, per la prima corsa o per tutti gli altri insiemi di dati in casi simili (ad esempio, qualora non sia possibile stimare un'efficienza massima), si applicheranno metodi statistici a variabile fissa di tipo I, come indicato sopra.

53. Se almeno due punti di dati si trovano sulla parte lineare della curva e se è possibile calcolare l'efficacia massima — come si prevede sia possibile fare per seconde corse svolte utilizzando una scala semilogaritmica per spaziare le concentrazioni di esposizione — occorre utilizzare un modello probit o logit, oppure un altro modello di regressione per calcolare le concentrazioni efficaci (es. EC50 e EC20).
54. I risultati vanno forniti sia sotto forma di grafici (grafici a barre che rappresentano la media $\pm$ 1 deviazione standard) sia di tabelle (LOEC/NOEC, direzione dell'effetto e entità massima della risposta nella parte dose-risposta dei dati; cfr., a titolo di esempio, la figura 3). La valutazione dei dati è considerata valida solo se basata su almeno due corse indipendenti. Un esperimento o una corsa sono considerati indipendenti se sono stati condotti in date diverse utilizzando una nuova serie di soluzioni e controlli. Il range di concentrazioni utilizzato nella seconda e terza corsa (se necessaria) può essere adattato in funzione dei risultati della prima corsa, per definire meglio l'intervallo dose-risposta contenente la LOEC (cfr. paragrafo 47).

Figura 3

Esempio di presentazione e valutazione dei dati ottenuti nel corso del saggio su H295R, sotto forma di grafico e tabella.

Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo con solvente ($p < 0,05$). LOEC: concentrazione minima alla quale si osserva un effetto significativo. Cambiamento massimo: entità massima della risposta osservata a una qualsiasi concentrazione rispetto alla risposta media dei controlli con solvente (= 1).



Sostanze chimiche	LOEC	Cambiamento massimo
Forscolina	0,01	0,15 volte
Letrozolo	0,001	29 volte

Protocollo per l'interpretazione dei dati

55. La sostanza chimica in esame è giudicata positiva se il fattore moltiplicativo d'induzione è statisticamente diverso ($p \leq 0,05$) dal controllo con solvente in due concentrazioni adiacenti, in almeno due corse indipendenti del saggio (tabella 7). La sostanza chimica in esame è giudicata negativa dopo due corse negative indipendenti oppure dopo tre corse delle quali due negative e una ambigua o positiva. Se i dati generati in tre esperimenti indipendenti non soddisfano i criteri decisionali elencati nella tabella 7, i risultati sperimentali non sono interpretabili. I risultati relativi a concentrazioni che superano il limite di solubilità o a concentrazioni citotossiche non vanno inclusi nell'interpretazione dei risultati.

Relazione sulla prova

56. La relazione comprende le seguenti informazioni:

Centro di saggio

- Nome del centro e ubicazione
- Responsabile dello studio e personale coinvolto, con le rispettive responsabilità
- Date di inizio e fine dello studio

Sostanza chimica in esame, reagenti e controlli

- Identità (nome/numero CAS, a seconda dei casi), origine, numero del lotto/della partita, purezza, fornitore, caratterizzazione della sostanza chimica in esame, dei reagenti e dei controlli
- Natura fisica e proprietà fisico-chimiche pertinenti della sostanza chimica in esame
- Condizioni di stoccaggio, metodo e frequenza di preparazione delle sostanze in esame, dei reagenti e dei controlli
- Stabilità della sostanza in esame

Cellule

- Origine e tipo di cellule
- Numero di passaggi (identificatore del passaggio delle cellule) per le cellule utilizzate nella prova
- Descrizione dei protocolli per la manutenzione delle colture cellulari

Requisiti pre-prova (se applicabili)

- Descrizione e risultati della prova di interferenza della sostanza chimica con la misura degli ormoni
- Descrizione e risultati delle misure dell'efficienza di estrazione degli ormoni
- Curve standard e di calibrazione per tutti i saggi analitici da effettuarsi
- Limiti di rivelazione per i saggi analitici selezionati

Condizioni sperimentali

- Composizione dei terreni di coltura
- Concentrazione della sostanza in esame
- Densità delle cellule (concentrazione delle cellule, stimata o misurata, a 24 e 48 ore)
- Solubilità della sostanza chimica in esame (limite di solubilità, se determinato)
- Tempo e condizioni di incubazione

Risultati della prova

- Dati grezzi per ciascun pozzetto per i controlli e le sostanze chimiche in esame — ogni misura replicata sotto forma dei dati originali forniti dallo strumento utilizzato per misurare la produzione di ormoni (ad esempio, densità ottica (OD), unità di fluorescenza, DPM ecc.)
- Validazione della normalità dei dati o spiegazioni riguardo alla loro trasformazione
- Risposte medie ± 1 SD per ciascun pozzetto misurato
- Dati di citotossicità (concentrazioni sperimentali che hanno provocato citotossicità)
- Conferma dell'osservanza dei requisiti CQ
- Variazione relativa rispetto al controllo con solvente, corretta per la citotossicità
- Un grafico a barre indicante il cambiamento relativo (fattore moltiplicativo) a ciascuna concentrazione, la SD e la significatività statistica, come indicato ai paragrafi da 49 a 54

Interpretazione dei dati

- Applicare il protocollo di interpretazione dei dati ai risultati e discutere l'esito

Discussione

- Dallo studio condotto emergono indicazioni circa la possibilità che i dati sul T o sull'E2 potrebbero essere influenzati da effetti indiretti sulla via glucocorticoide e sulla via mineralcorticoide?

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in Appendix 2 to Chapter B.54 of this Annex
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. e Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., e Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.
- (4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Available at [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Disponibile qui: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Available at: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvts/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
- (7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. e Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- (8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. e Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- (9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. e Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265-272.
- (10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. e Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- (11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. e La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- (12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. e Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- (13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. e Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- (14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. e Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- (15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. e Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731-737.
- (16) Capitolo B.55 del presente allegato: Saggio di Hershberger sul ratto: saggio di screening a breve termine delle proprietà (anti)androgeniche.
- (17) Shapiro, R., e Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- (18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.

-
- (19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
- (20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.
-

Appendice

DEFINIZIONI

Confluenza: copertura o proliferazione consentita alle cellule nel terreno di coltura.

Controllo della qualità (CQ): attuazione delle misure necessarie per garantire la validità dei dati.

Corsa: un esperimento indipendente caratterizzato da una nuova serie di soluzioni e di controlli.

CV: coefficiente di variazione, cioè il rapporto tra la deviazione standard di una distribuzione e la sua media aritmetica.

CYP: monoossigenasi del citocromo P450; una famiglia di geni e gli enzimi da essi prodotti, coinvolti nella catalisi di svariate reazioni biochimiche, inclusa la sintesi e il metabolismo degli ormoni steroidei.

DPM: disintegrazioni per minuto; numero di atomi in una determinata quantità di materiale radioattivo il cui decadimento avviene in un minuto.

E2: 17 β -estradiolo, l'estrogeno più importante nei sistemi dei mammiferi.

H295R: cellule umane di carcinoma surrenalico che hanno le caratteristiche fisiologiche delle cellule surrenali fetali umane zonalmente indifferenziate e che esprimono tutti gli enzimi della via steroidogenica. Si possono ottenere dall'ATCC.

Intervallo di linearità: intervallo nella curva standard di un sistema di misura degli ormoni dove i risultati sono proporzionali alla concentrazione dell'analita presente nel campione.

LOEC, Lowest Observed Effect Concentration: concentrazione minima alla quale, nell'ambito della prova, si osserva un effetto statisticamente significativo rispetto a un controllo con il solo solvente.

LOQ, Limit of quantification: limite di quantizzazione, ovvero la concentrazione più bassa di sostanza chimica che produce un segnale sufficientemente maggiore del bianco da poter essere rilevato, entro un determinato limite di confidenza. Al fine del presente metodo, il LOQ viene generalmente definito dal fabbricante del sistema sperimentale, salvo altre indicazioni.

NOEC, No Observed Effect Concentration: concentrazione senza effetti osservati, ovvero la più elevata concentrazione sperimentata alla quale la prova non fornisce una risposta positiva.

Passaggio: numero di volte in cui le cellule vengono divise dopo aver iniziato una coltura a partire da una soluzione congelata. Il passaggio iniziale dalla soluzione congelata è indicato come "passaggio 1". Le cellule divise una volta vengono indicate come "passaggio 2" ecc.

PBS: tampone fosfato salino di Dulbecco.

Piastra per il controllo della qualità: piastra a 24 pozzetti contenente due concentrazioni dei controlli positivi e negativi per sorvegliare le prestazioni di un nuovo lotto di cellule o per fornire i controlli positivi per la prova quando vengono testate delle sostanze chimiche.

Piastra sperimentale: la piastra sulla quale le cellule H295R vengono esposte alle sostanze in esame. Contiene il controllo con solvente e la sostanza chimica, in sette livelli di concentrazione e in triplicato.

Soluzione madre: base per la preparazione di altri reagenti. Consiste in una miscela 1:1 di DMEM (mezzo di Eagle modificato da Dulbecco) e di miscela nutriente Ham F-12 (DMEM/F12) in 15mM di tampone HEPES senza rosso di fenolo né bicarbonato di sodio. Il bicarbonato di sodio viene aggiunto come tampone, cfr. appendice II della relazione di validazione (4).

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Steroidogenesi: via metabolica che a partire dal colesterolo conduce alla produzione dei vari ormoni steroidei. Nella via metabolica degli steroidi intervengono diverse sostanze intermedie quali il progesterone e il testosterone che non solo sono importanti in sé ma che fungono anche da precursori degli ormoni sintetizzati a valle.

T: testosterone, uno dei due più importanti androgeni nei sistemi dei mammiferi.

Terreno di congelazione: mezzo utilizzato per congelare e conservare cellule congelate. È costituito da soluzione madre alla quale viene aggiunto del BD Nu-Serum e del dimetilsolfossido.

Terreno supplementato: soluzione con l'aggiunta di BD Nu-Serum e ITS+ Premix, cfr. appendice II della relazione di validazione(4).

Tripsina 1X: una soluzione diluita dell'enzima tripsina, una serina proteasi pancreatica, utilizzata per staccare le cellule da una piastra di coltura, cfr. appendice III della relazione di validazione (4).

B.58. SAGGI DI MUTAGENESI DI CELLULE SOMATICHE E GERMINALI DI RODITORI TRANSGENICI**INTRODUZIONE**

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 488 (2013). I metodi di prova dell'UE sono disponibili per tutta una serie di saggi di mutagenesi in vitro che consentono di individuare le mutazioni cromosomiche e/o geniche. Alcuni metodi di prova consentono di valutare gli endpoint in vivo (vale a dire le aberrazioni cromosomiche e la sintesi non programmata del DNA), ma non misurano le mutazioni geniche. I saggi di mutagenesi nei roditori transgenici (RTG) rispondono all'esigenza di condurre saggi di mutagenesi in vivo che siano pratici e ampiamente disponibili.
2. I saggi di mutagenesi in RTG sono stati sottoposti ad un esame approfondito (24) (33). Tali saggi sono condotti su ratti e topi transgenici che contengono copie multiple di vettori bifunzionali di plasmidi o fagi integrati nei cromosomi. I transgeni contengono geni reporter per l'individuazione di vari tipi di mutazioni indotte in vivo dalle sostanze in esame.
3. Le mutazioni che si manifestano in un roditore sono quantificate mediante il recupero del transgene e l'analisi del fenotipo del gene reporter in un ospite batterico privo del gene reporter. I saggi di mutagenesi in RTG consentono di misurare le mutazioni indotte in geni geneticamente neutri presenti praticamente in qualsiasi tessuto del roditore. Tali saggi consentono pertanto di superare molte delle limitazioni che attualmente ostacolano lo studio della mutazione genica in vivo in geni endogeni (ad esempio, la limitata quantità di tessuti adatti all'analisi, la selezione positiva/negativa rispetto alle mutazioni).
4. I dati disponibili indicano che i transgeni rispondono ai mutageni in modo analogo ai geni endogeni, soprattutto per quanto riguarda l'individuazione della sostituzione di una coppia di basi, le mutazioni per spostamento del sistema di lettura e le piccole delezioni e inserzioni (24).
5. Gli workshop internazionali sui saggi di genotossicità (IWGT) hanno approvato l'inclusione dei saggi di mutagenesi in RTG ai fini dell'individuazione in vivo delle mutazioni geniche ed hanno raccomandato un protocollo di sperimentazione (15) (29). Il presente metodo di prova si basa su tali raccomandazioni. Ulteriori analisi a sostegno dell'applicazione di tale protocollo sono riportate al punto (16).
6. Si prevede che in futuro potrebbe essere possibile combinare i saggi di mutagenesi in RTG con uno studio di tossicità a dosi ripetute (capitolo B.7 del presente allegato). Tuttavia, è necessario ottenere dati a dimostrazione del fatto che la sensibilità dei saggi di mutagenesi in RTG non è influenzata dal periodo di tempo più corto che intercorre tra la fine del periodo di somministrazione e il momento del campionamento. Tale periodo è di un giorno nei saggi di tossicità a dosi ripetute, mentre è di tre giorni nei saggi di mutagenesi in RTG. Sono altresì necessari dati che dimostrino che i risultati del saggio di tossicità a dosi ripetute non sono compromessi dall'utilizzo di un ceppo di roditore transgenico anziché di un ceppo di roditore tradizionale. Non appena saranno disponibili i dati citati, il presente metodo di prova sarà aggiornato.
7. Le definizioni dei termini chiave figurano nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

8. I saggi di mutagenesi in RTG il cui utilizzo nell'ambito del presente metodo di prova è suffragato da un numero di dati sufficienti sono i seguenti: topi batteriofagi *lacZ* (Muta™Mouse); topi plasmidi *lacZ*; topi, ratti *gpt* delta (*gpt* e *Sp1*); topi, ratti *lacI* (Big Blue®), condotti in condizioni normali. Inoltre, il saggio di selezione positiva *cII* può essere utilizzato per valutare le mutazioni nei modelli Big Blue® e Muta™Mouse. Nei modelli di RTG, il parametro utilizzato per valutare la mutagenesi è normalmente la frequenza dei mutanti; tuttavia, un'analisi molecolare delle mutazioni può, se necessario, fornire ulteriori informazioni (cfr. paragrafo 24).
9. Tali saggi di mutagenesi in vivo sui roditori sono particolarmente rilevanti ai fini di valutare il rischio mutageno, in quanto le risposte al saggio dipendono dal metabolismo in vivo, dalla farmacocinetica, dai processi di riparazione del DNA e dalla sintesi translesione del DNA, benché tali parametri possano variare in funzione delle specie, dei tessuti e del tipo di danno subito dal DNA. Un saggio di mutagenesi in vivo è utile per approfondire lo studio dell'effetto mutageno individuato da un sistema in vitro e per dare seguito ai risultati di test che utilizzano altri endpoint in vivo (24). Oltre al fatto di presentare un rapporto di causalità con l'insorgere di tumori, le mutazioni geniche costituiscono un endpoint pertinente per prevedere le patologie non tumorali su base mutagena nei tessuti somatici (12) (13), nonché le patologie trasmesse tramite le cellule germinali.

10. Se è comprovato che la sostanza in esame o il metabolita pertinente non raggiunge nessuno dei tessuti d'interesse, non è opportuno ricorrere al saggio di mutagenesi in RTG.

PRINCIPIO DEL METODO

11. Nei saggi descritti al paragrafo 8, il gene bersaglio è di origine batterica o batteriofaga, e il recupero dal DNA genomico del roditore si effettua mediante introduzione del transgene in un vettore bifunzionale batteriofago λ o plasmide. Questa procedura comporta l'estrazione del DNA genomico dal tessuto di interesse del roditore, il trattamento in vitro del DNA genomico (ossia impaccamento dei vettori λ o ligazione ed elettroporazione dei plasmidi per recuperare il vettore bifunzionale) e la successiva individuazione di mutazioni negli ospiti batterici in condizioni adeguate. I saggi utilizzano transgeni neutri che sono facilmente recuperabili dalla maggior parte dei tessuti.
12. L'esperimento base di mutagenesi in RTG comporta la somministrazione al roditore di una sostanza chimica per un certo periodo. Le sostanze possono essere somministrate con qualsiasi modalità idonea, compreso l'impianto (ad esempio, test di dispositivi medici). L'intero periodo durante il quale l'animale assume la sostanza è chiamato periodo di somministrazione. La somministrazione è generalmente seguita da un periodo, precedente al sacrificio, durante il quale essa è sospesa e le lesioni non riparate del DNA si stabilizzano sotto forma di mutazioni stabili. In letteratura, tale periodo è variamente denominato "periodo di manifestazione", "periodo di stabilizzazione" o "periodo di espressione". Il termine di tale periodo coincide con il periodo di campionamento (15) (29). Dopo il sacrificio dell'animale, il DNA genomico è isolato dal tessuto o dai tessuti di interesse e purificato.
13. I dati relativi ad un unico tessuto per animale, ottenuti mediante impaccamenti/ligazioni multipli sono di norma aggregati, e la frequenza dei mutanti è di norma valutata utilizzando un numero totale di unità formanti placche o unità formanti colonie compreso negli ordini di grandezza 10^5 e 10^8 . Se si ricorre a metodi di selezione positiva, il numero totale delle unità formanti placche è determinato mediante una distinta serie di piastre non selettive.
14. I metodi di selezione positiva sono stati sviluppati per individuare più facilmente le mutazioni sia del gene *gpt* [topi e ratti *gpt* delta o fenotipo *gpt*⁻ (20) (22) (28)] e del gene *lacZ* [MutaTMMouse o topi plasmide *lacZ* (3) (10) (11) (30)]; mentre le mutazioni del gene *lacI* negli animali Big Blue® sono individuate mediante un metodo non selettivo che consente di identificare i mutanti mediante la generazione di placche colorate (blu). I metodi di selezione positiva sono inoltre applicati per individuare le mutazioni puntiformi del gene *cII* del vettore bifunzionale batteriofago λ [topi o ratti Big Blue®, e MutaTMMouse) (17)] e le mutazioni per delezione nei geni λ *red* e *gam* [selezione Spi⁻ nei topi e ratti *gpt* delta) (21) (22) (28)]. Si ottiene la frequenza dei mutanti dividendo il numero di placche/plasmidi contenenti mutazioni che si trovano nel transgene per il numero totale di placche/plasmidi recuperati nel medesimo campione di DNA. Negli studi sulla mutagenesi in RTG, la frequenza dei mutanti è il parametro di osservazione. Inoltre, una frequenza di mutazioni può essere determinata come frazione delle cellule che contengono mutazioni indipendenti; questo calcolo richiede di correggere l'espansione clonale mediante sequenziamento dei mutanti recuperati (24).
15. Le mutazioni registrate nei saggi di mutazione puntiforme *lacI*, *lacZ*, *cII* e *gpt* consistono essenzialmente in sostituzioni delle coppie di basi, mutazioni per spostamento del sistema di lettura e in piccole inserzioni/delezioni. La proporzione relativa di questi tipi di mutazioni rispetto alle mutazioni spontanee è analoga a quella osservata per il gene endogeno *Hprt*. Si osservano grandi delezioni soltanto con i saggi di selezione Spi⁻ e di plasmidi *lacZ* (24). Le mutazioni d'interesse sono le mutazioni in vivo che si manifestano in topi o ratti. Le mutazioni in vitro e ex vivo, che possono verificarsi al momento del recupero dei batteriofagi/plasmidi, della replicazione e riparazione, sono relativamente rare e possono, in alcuni sistemi, essere specificamente identificate, o escluse dal sistema di selezione positiva/dell'ospite batterico.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione della specie animale

16. Sono attualmente disponibili diversi modelli di topi transgenici per il rilevamento delle mutazioni geniche, e tali sistemi trovano tuttora più ampia applicazione dei modelli che si avvalgono di ratti transgenici. Qualora il ratto fosse evidentemente più indicato, ai fini dello studio, del topo (per esempio quando si studia il meccanismo della carcinogenesi di un tumore constatato solo nei ratti, per stabilire una correlazione con uno studio di tossicità nei ratti o se è noto che il metabolismo dei ratti è più rappresentativo del metabolismo umano), va preso in considerazione il ricorso a modelli di ratti transgenici.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

17. La temperatura dello stabulario deve essere idealmente di 22 °C ($\pm$ 3 °C). Benché l'umidità relativa debba essere almeno del 30 % e, di preferenza non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia della sala, l'obiettivo è di mantenere un'umidità relativa del 50-60 %. La luce è artificiale, con una sequenza quotidiana di 12 ore di luce seguite da 12 ore di buio. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata con questo metodo. Gli animali vanno stabulati in piccoli gruppi (massimo cinque) dello stesso sesso se non si prevede alcun comportamento aggressivo. Gli animali possono essere stabulati individualmente se ciò è giustificato dal punto di vista scientifico.

Preparazione degli animali

18. I giovani esemplari adulti in buona salute e sessualmente maturi (di 8-12 settimane di età all'inizio del trattamento) sono distribuiti a caso nei gruppi di trattamento e di controllo. Gli animali devono essere identificati in modo univoco. Gli animali devono essere acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio dello studio. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali devono essere minime e non superare il $\pm$ 20 % del peso medio per sesso.

Preparazione delle dosi

19. Le sostanze solide in esame vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati solventi o mezzi disperdenti o mescolate alla dieta o all'acqua da bere prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima del trattamento. In caso di esposizione per via inalatoria, le sostanze possono essere somministrate sotto forma di gas, vapore o aerosol solido o liquido, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche. Vanno usati preparati freschi della sostanza, salvo qualora i dati sulla stabilità dimostrino che la conservazione è accettabile.

Condizioni sperimentali*Solvente/mezzo disperdente*

20. Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso.

Controlli positivi

21. Di norma devono essere utilizzati in parallelo animali per i controlli positivi. Tuttavia, per i laboratori che hanno dato prova della loro competenza (cfr. paragrafo 23) e che usano sistematicamente i presenti saggi, il DNA di animali trattati in precedenza e usati ai fini di controllo positivo può essere incluso in ciascuno studio per confermare il successo del metodo. È opportuno che detto DNA proveniente da precedenti esperienze sia ottenuto dalla stessa specie e dagli stessi tessuti di interesse, e sia stato conservato correttamente (cfr. paragrafo 36). Quando sono utilizzati controlli positivi in parallelo, non è necessario somministrarli attraverso lo stesso canale usato per la sostanza in esame. Bisognerebbe tuttavia avere la certezza che i controlli positivi inducono mutazioni in uno o più tessuti d'interesse per la sostanza in esame. Le dosi delle sostanze utilizzate come controlli positivi sono selezionate in modo da produrre effetti deboli o moderati che consentano di valutare criticamente le prestazioni e la sensibilità del saggio. Esempi di sostanze usate come controlli positivi e di alcuni loro tessuti bersaglio figurano nella tabella 1.

Tabella 1

Esempi di sostanze usate come controlli positivi e di alcuni loro tessuti bersaglio

Sostanza usata per i controlli positivi e numero CAS	Nome EINECS e numero EINECS	Caratteristiche	Tessuto bersaglio della mutazione	
			Ratto	Topo
N-nitroso-N-ethylurea Numero [CAS 759-73-9]	N-nitroso-N-ethylurea [212-072-2]	Mutageno ad azione diretta	Fegato, polmone	Midollo osseo, colon, epitelio del colon intestino, fegato, polmone, milza, rene, cellule granulose dell'ovaio, cellule germinali maschili

Sostanza usata per i controlli positivi e numero CAS	Nome EINECS e numero EINECS	Caratteristiche	Tessuto bersaglio della mutazione	
			Ratto	Topo
Carbammato di etile (uretano) Numero [CAS 51-79-6]	Uretano [200-123-1]	Mutageno, richiede di essere metabolizzato ma produce solo effetti deboli		Midollo osseo, prestomaco, intestino tenue, fegato, polmone, milza
2,4-toluenediammina Numero [CAS 95-80-7]	4-metil-m-fenilendiammina [202-453-1]	Mutageno, richiede di essere metabolizzato, positivo anche nel saggio Spi ⁻	Fegato	Fegato
Benzo[a]pirene Numero [CAS 50 32-8]	Benzo[def]crisene [200-028-5]	Mutageno, richiede di essere metabolizzato	Fegato, omento	Midollo osseo, mammella, colon, prestomaco, stomaco ghiandolare, cuore, fegato, polmone, cellule germinali maschili

Controlli negativi

22. In ogni fase del campionamento devono includere controlli negativi, cui sia somministrato solo il solvente o il mezzo disperdente, senza altre differenze di trattamento. In mancanza di dati storici o pubblicati che dimostrino che il solvente/mezzo disperdente scelto non induce effetti nocivi o mutageni, anche controlli non trattati andrebbero inclusi in ciascuna fase di campionamento per stabilire l'accettabilità del controllo con il mezzo disperdente.

Verifica delle competenze del laboratorio

23. La competenza a svolgere i presenti saggi deve essere stabilita comprovando la capacità di riprodurre i risultati attesi da dati pubblicati (24) riguardanti: 1) la frequenza di mutanti con le sostanze di controllo positivo (comprese risposte deboli), come quelle elencate nella tabella 1, con non mutageni e con controlli del mezzo disperdente; e 2) il recupero dei transgeni dal DNA genomico (ad esempio, efficienza di impaccamento).

Sequenziamento dei mutanti

24. Ai fini regolamentari il sequenziamento del DNA dei mutanti non è obbligatorio, in particolare in caso di risultato nettamente positivo o negativo. Tuttavia, i dati del sequenziamento possono essere utili se si osservano considerevoli variazioni interindividuali. In questi casi, il sequenziamento può servire ad escludere l'ipotesi di jackpot o fenomeni di clonazione, individuando la proporzione dei mutanti unici in uno specifico tessuto. Sequenziare circa 10 mutanti per ciascun tessuto e per animale è sufficiente per determinare se i mutanti clonali contribuiscono alla frequenza dei mutanti; sequenziare fino a 25 mutanti può essere necessario per correggere matematicamente gli aspetti della clonalità nella frequenza dei mutanti. Il sequenziamento dei mutanti può essere preso in considerazione anche nel caso di piccoli incrementi nella frequenza dei mutanti (cioè quando la frequenza è leggermente superiore ai valori dei controlli non trattati). Le differenze nello spettro dei mutanti tra le colonie di mutanti osservate negli animali trattati e non trattati possono sostenere l'ipotesi di un effetto mutageno (29). Inoltre, gli spettri di mutazione possono servire ad elaborare ipotesi meccanicistiche. Se il sequenziamento rientra nel protocollo di studio, è necessario prestare particolare attenzione alla concezione di tali studi, con particolare riferimento al numero di mutanti sequenziati per campione, al fine di ottenere una potenza statistica adeguata a seconda del modello statistico utilizzato (cfr. paragrafo 43).

PROTOCOLLO

Numero e sesso degli animali

25. Si deve stabilire un numero sufficientemente elevato di animali per ottenere la potenza statistica necessaria ad individuare una frequenza dei mutanti almeno raddoppiata. Ciascun gruppo è composto da almeno 5 animali. Se tuttavia la potenza statistica è insufficiente, si utilizza un maggior numero di animali, come necessario. Di norma vanno utilizzati animali maschi. In alcuni casi può essere giustificato fare ricorso esclusivo alle femmine, ad esempio, nei saggi relativi a medicinali destinati ad essere utilizzati in modo specifico da donne, o negli studi in cui si analizza specificamente il metabolismo femminile. In caso di differenze significative tra i sessi in termini di tossicità o metabolismo, dovranno essere utilizzati sia maschi che femmine.

Periodo di somministrazione

26. Considerando che le mutazioni si accumulano ad ogni trattamento, si rende necessario un regime a dosi ripetute, con somministrazioni giornaliere per un periodo di 28 giorni. Questa impostazione è generalmente ritenuta accettabile sia per produrre un accumulo sufficiente di mutazioni da mutageni deboli sia per fornire un tempo di esposizione adeguato per rilevare le mutazioni negli organi a proliferazione lenta. Trattamenti alternativi possono essere adattati per alcune valutazioni, e tali calendari di dosaggio alternativi devono essere scientificamente giustificati nel protocollo. Il periodo di dosaggio non deve essere più breve del tempo necessario per l'induzione completa di tutti gli enzimi coinvolti nel metabolismo e i dosaggi di durata più breve possono richiedere il ricorso a tempi di campionamento multiplo adattati agli organi con diversi tassi di proliferazione. In entrambi i casi, tutte le informazioni disponibili (ad esempio quelle sulla tossicità generale o sul metabolismo e la farmacocinetica) vanno utilizzate quando si tratta di giustificare un protocollo, in particolare se quest'ultimo si discosta dalle raccomandazioni standard sopra descritte. Poiché possono aumentare la sensibilità, i tempi di dosaggio superiori a 8 settimane devono essere spiegati chiaramente e giustificati, in quanto i tempi di trattamento lunghi possono generare un aumento apparente della frequenza di mutanti per espansione clonale (29).

Livelli di dose

27. I livelli di dose devono essere determinati sulla base dei risultati di uno studio di determinazione degli intervalli di dosaggio che misura la tossicità generale, condotto utilizzando la stessa via di esposizione, o sui risultati di studi esistenti sulla tossicità subacuta. Gli animali non transgenici appartenenti al medesimo ceppo di roditori possono essere utilizzati per determinare tali intervalli di dose. Nel saggio principale, per ottenere informazioni sulla relazione dose-risposta, uno studio completo deve includere un gruppo di controllo negativo (cfr. paragrafo 22) e almeno tre livelli di dose, distribuiti in modo appropriato, eccetto quando è stata utilizzata la dose limite (cfr. paragrafo 28). Il livello di dose massimo è la dose massima tollerata (DMT), che è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali. Le sostanze con azione biologica specifica, a dosi basse non tossiche (come ormoni e mitogeni) e le sostanze che manifestano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche possono essere considerate eccezioni rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. I livelli di dose utilizzati sono compresi in un intervallo che va dalla tossicità massima a una tossicità modica o assente.

Saggio limite

28. Se gli esperimenti per determinare gli intervalli di dose o i dati disponibili relativi ai ceppi di roditori affini indicano che un trattamento uguale o superiore alla dose limite (cfr. sotto) non produce effetti tossici osservabili, e se non si prevede genotossicità sulla base dei dati relativi alle sostanze chimiche strutturalmente affini, uno studio completo con tre livelli di dose può non essere considerato necessario. Per un periodo di somministrazione di 28 giorni (ossia 28 somministrazioni giornaliere), la dose limite è pari a 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno. Per periodi di somministrazione di durata pari o inferiore a 14 giorni, la dose limite è pari a 2 000 mg/kg di peso corporeo/giorno (i calendari di dosaggio diversi da 28 somministrazioni giornaliere devono essere oggetto di una giustificazione scientifica nel protocollo, cfr. paragrafo 26).

Somministrazione delle dosi

29. La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione adeguata. In generale, nella concezione di un saggio va considerata la via d'esposizione umana prevista. Di conseguenza, le altre vie di esposizione (ad esempio, acqua da bere, subcutanea, endovenosa, topica, inalatoria, intratracheale, alimentare o impianto) sono accettabili se possano essere giustificate. Le iniezioni intraperitoneali non sono raccomandate in quanto la cavità intraperitoneale non è una via di esposizione umana fisiologicamente pertinente. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio, ma non deve in ogni caso superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori deve essere giustificato. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose.

Periodo di campionamento*Cellule somatiche*

30. Il periodo di campionamento è una variabile fondamentale in quanto dipende dal periodo necessario affinché le mutazioni siano stabilizzate. Tale periodo è funzione specifica dei tessuti e sembra essere correlato al tempo di rinnovo della popolazione cellulare: il midollo osseo e l'intestino reagiscono rapidamente, mentre il fegato risponde molto più lentamente. Un periodo di 28 giorni di trattamenti consecutivi (come indicato al paragrafo 26)

e un campionamento tre giorni dopo l'ultima somministrazione sembrano un compromesso accettabile per la misurazione delle frequenze dei mutanti nei tessuti sia a rapida che a lenta proliferazione, sebbene in tali condizioni la frequenza massima di mutanti possa non manifestarsi nei tessuti a proliferazione lenta. Se i tessuti a crescita lenta sono di fondamentale importanza, può rivelarsi più indicato un periodo di campionamento di 28 giorni successivo al periodo di somministrazione di 28 giorni (16) (29). In tal caso, il periodo di campionamento di 28 giorni sostituisce il periodo di campionamento di 3 giorni e richiede una giustificazione scientifica.

Cellule germinali

31. I saggi sui RTG risultano particolarmente adatti allo studio dell'induzione di mutazioni geniche nelle cellule germinali maschili (7) (8) (27), per le quali i tempi e la cinetica della spermatogenesi sono stati ben definiti (27). Il basso numero di ovuli disponibili per l'analisi, anche a seguito di superovulazione, e il fatto che non vi sia alcuna sintesi del DNA nell'ovocita impediscono di determinare, mediante saggi transgenici, se le cellule germinali femminili hanno subito una mutazione (31).
32. Il periodo di campionamento per le cellule germinali maschili va scelto in modo che sia campionata la gamma dei tipi di cellule esposte nell'intera fase dello sviluppo delle cellule germinali e in modo che la fase interessata dal campionamento sia stata sufficientemente esposta. La progressione dello sviluppo delle cellule germinali, dalla fase di cellule staminali spermatogoniali alla fase di sperma maturo che raggiunge il vaso deferente/la coda dell'epididimo, dura circa 49 giorni nei topi (36) e circa 70 giorni nei ratti (34) (35). Dopo un periodo di esposizione di 28 giorni, seguito da un periodo di campionamento minimo di tre giorni, lo sperma accumulato e raccolto presso il vaso deferente/la coda dell'epididimo (7) (8) rappresenta una popolazione di cellule la cui esposizione è pressoché avvenuta durante la seconda metà della spermatogenesi, che include il periodo meiotico e postmeiotico, ma non le fasi delle cellule spermatogoniali o staminali. Per un corretto campionamento delle cellule del vaso deferente/della coda dell'epididimo che erano cellule staminali spermatogoniali durante il periodo di esposizione, è necessario un ulteriore periodo di campionamento di minimo 7 settimane (topi) o 10 settimane (ratti) al termine del trattamento.
33. Le cellule espulse dai tubuli seminiferi dopo un regime di 28 + 3 giorni sono composte da una popolazione mista arricchita per tutte le fasi delle cellule germinali in via di sviluppo (7) (8). Il campionamento di tali cellule per l'individuazione di mutazioni geniche non fornisce una valutazione così precisa delle fasi in cui sono indotte le mutazioni delle cellule germinali quanto il campionamento degli spermatozoi del vaso deferente/della coda dell'epididimo (perché le cellule germinali prelevate dai tubuli sono di vari tipi, tra cui sono probabilmente presenti cellule somatiche che contaminano tale popolazione di cellule). Tuttavia, il campionamento delle cellule prelevate dai tubuli seminiferi in aggiunta agli spermatozoi prelevati nel vaso deferente/nella coda dell'epididimo dopo un regime di 28 + 3 giorni di campionamento consentirebbe di includere in certa misura le cellule esposte durante la maggior parte delle fasi di sviluppo delle cellule germinali e sarebbe utile per l'individuazione di alcuni dei mutageni delle cellule germinali.

Osservazioni

34. Le osservazioni cliniche generali devono essere effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa ora e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Vanno registrate le informazioni concernenti le condizioni di salute degli animali. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbidità e la mortalità. Ogni animale viene pesato almeno una volta alla settimana, così come subito dopo essere stato sacrificato. La misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame è diluita in acqua prima di essere somministrata, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di eccessiva, ma non letale, tossicità vanno soppressi prima della fine del periodo di saggio (23).

Raccolta dei tessuti

35. Gli argomenti addotti per motivare la raccolta dei tessuti vanno chiaramente definiti. Dato che è possibile studiare l'induzione di mutazioni praticamente in qualsiasi tessuto, la selezione dei tessuti da raccogliere va fatta in funzione dei motivi che hanno condotto alla realizzazione dello studio e dei dati già esistenti relativi alla mutagenicità, cancerogenicità o tossicità della sostanza in esame. Tra gli elementi importanti da prendere in considerazione vi sono la via di somministrazione (basata sulle probabili vie d'esposizione per gli esseri umani), la distribuzione tissutale prevista e il possibile meccanismo d'azione. In assenza di informazioni di contesto, devono essere raccolti diversi tessuti somatici, in funzione dell'interesse che rappresentano. Si tratterà di tessuti a rapida proliferazione, a crescita lenta e tessuti appartenenti al sito di contatto. Inoltre, gli spermatozoi del vaso deferente/della coda dell'epididimo e le cellule germinali in via di sviluppo prelevate dai tubuli seminiferi (come descritte ai paragrafi 32 e 33) devono essere raccolti e conservati per il caso in cui si rendesse necessario in futuro un'analisi della mutagenicità delle cellule germinali. Gli organi vanno pesati e per gli organi più grandi va prelevata la medesima zona su tutti gli animali.

Stoccaggio di tessuti e DNA

36. I tessuti (o loro omogeneizzati) vanno stoccati ad una temperatura uguale o inferiore a -70°C e utilizzati per l'isolamento del DNA entro 5 anni. Il DNA isolato, conservato refrigerato ad una temperatura di 4°C in una idonea soluzione tampone, va idealmente utilizzato per l'analisi delle mutazioni entro un anno.

Selezione dei tessuti per l'analisi dei mutanti

37. I tessuti vanno selezionati in funzione dei seguenti criteri: 1) la via di somministrazione o il sito di primo contatto (stomaco ghiandolare nel caso di somministrazione per via orale, polmoni nel caso di somministrazione per inalazione o pelle nel caso di somministrazione per via topica); e 2) i parametri farmacocinetici osservati negli studi di tossicità generale, che indicano l'eliminazione, la ritenzione o l'accumulo nei tessuti o gli organi bersaglio per la tossicità. Qualora si conducano studi per dar seguito a studi sulla cancerogenicità, vanno presi in considerazione i tessuti bersaglio per la cancerogenicità. La scelta dei tessuti da analizzare deve ottimizzare l'individuazione delle sostanze che agiscono come mutageni in vitro ad azione diretta, sono metabolizzate rapidamente, sono altamente reagenti o scarsamente assorbite, o per le quali il tessuto bersaglio è determinato in base alla via di somministrazione (6).
38. In assenza di informazioni di contesto, e se si tiene conto del sito di contatto in funzione della via di somministrazione, va valutata la mutagenicità del fegato e di almeno un tessuto a divisione rapida (ad esempio, stomaco ghiandolare, midollo osseo). Nella maggior parte dei casi tali requisiti possono essere soddisfatti dall'analisi di due tessuti accuratamente selezionati, ma in alcuni casi sono necessari tre o più tessuti. Se c'è motivo di particolare preoccupazione riguardo agli effetti sulle cellule germinali, anche a motivo di risposte positive nelle cellule somatiche, devono essere valutate le mutazioni nei tessuti delle cellule germinali.

Metodi di misurazione

39. Metodi standard di laboratorio o pubblicati per l'individuazione di mutanti sono disponibili per i modelli transgenici raccomandati: batteriofago lambda e plasmide *lacZ* (30); topo *lacI* (2) (18); topo *gpt* delta (22); ratto *gpt* delta (28); *cII* (17). Le modifiche devono essere giustificate e corredate di adeguata documentazione. I dati provenienti da impaccamenti multipli possono essere aggregati e utilizzati per raggiungere un numero adeguato di placche o colonie. Tuttavia, la necessità di ricorrere a molte reazioni da impaccamento per raggiungere il numero idoneo di placche può essere un indicatore della qualità scadente del DNA. In questi casi, si deve procedere con maggiore cautela perché i dati potrebbero essere inaffidabili. Il numero ottimale di placche o di colonie per campione di DNA dipende dalla probabilità statistica di individuare mutanti in numero sufficiente ad una determinata frequenza di mutazioni spontanee. In generale, è necessario un minimo di 125 000-300 000 placche se la frequenza delle mutazioni spontanee è nell'ordine di circa 3×10^{-5} (15). Per il saggio *lacI* Big Blue® occorre altresì dimostrare che l'intera gamma dei fenotipi mutanti di colore può essere individuata mediante l'inclusione contemporanea di appropriati controlli del colore a ogni piastratura. I tessuti e i campioni risultanti (*item*) devono essere trattati e analizzati secondo uno schema a blocchi, in cui gli *item* del gruppo di controllo solvente/mezzo disperdente, del gruppo di controllo positivo (se utilizzato) o del DNA del controllo positivo (se del caso) e di ciascun gruppo di trattamento sono analizzati insieme.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

40. I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. L'unità sperimentale è l'animale. La relazione deve contenere il numero totale di unità formanti placche (pfu) o di unità formanti colonie (cfu), il numero di mutanti e la frequenza dei mutanti per ciascun tessuto di ciascun animale. In caso di reazioni multiple da impaccamento/recupero, la relazione deve riportare il numero di reazioni per campione di DNA. Mentre si devono conservare i dati relativi a ciascuna reazione individuale, è sufficiente riportare solo il numero totale delle unità formanti placche o delle unità formanti colonie. I dati sulla tossicità e i segni clinici quali descritti nel paragrafo 34 vanno riportati nella relazione. Vanno indicati i risultati del sequenziamento per ciascun mutante analizzato, così come i calcoli della frequenza delle mutazioni risultanti per ciascun animale e ciascun tessuto.

Valutazione statistica e interpretazione dei risultati

41. Esistono diversi criteri per stabilire se un risultato è positivo, quali un aumento della frequenza dei mutanti correlata alle dosi somministrate o un netto aumento della frequenza dei mutanti in un unico gruppo sottoposto a trattamento rispetto al gruppo di controllo esposto a solvente/mezzo disperdente. Almeno tre gruppi soggetti esposti alla sostanza in esame devono essere analizzati al fine di ottenere dati sufficienti per l'analisi della relazione dose-risposta. Fermo restando che la rilevanza biologica dei risultati va considerata prioritaria, metodi statistici appropriati possono servire da sostegno alla valutazione dei risultati sperimentali (4) (14) (15) (25) (26). Nei test statistici l'unità sperimentale è l'animale.

42. Una sostanza in esame i cui risultati non soddisfano i criteri sopra descritti per qualsiasi tessuto è considerata non mutagena ai fini del presente saggio. Ai fini della rilevanza biologica di un risultato negativo è opportuno confermare l'esposizione del tessuto.
43. Per le analisi del sequenziamento del DNA, sono disponibili diversi metodi statistici che aiutano ad interpretare i risultati (1) (5) (9) (19).
44. Il fatto di stabilire se i valori osservati rientrano o trascendono l'intervallo storico di controllo può fornire informazioni importanti ai fini della valutazione della significatività biologica della risposta (32).

Relazione sul saggio

45. La relazione sul saggio deve riportare le informazioni seguenti:

Sostanza chimica in esame:

- dati di identificazione e numero CAS, se noto
- fonte, numero del lotto se disponibile;
- caratteristiche fisiche e purezza;
- proprietà fisico-chimiche rilevanti per l'esecuzione dello studio;
- stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

Solvente/mezzo disperdente:

- motivazione della scelta del mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;
- preparazione dei preparati per somministrazione via alimentare, con l'acqua da bere e per inalazione;
- determinazione analitica dei preparati (ad esempio, stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali).

Animali sperimentali

- specie/ceppo utilizzato e giustificazione della scelta effettuata,
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di stabulazione, dieta ecc.,
- peso dei singoli animali all'inizio del saggio, con intervallo, media e deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni sperimentali

- controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente),
- dati derivati dallo studio per individuare gli intervalli;
- criteri di selezione delle dosi;
- dettagli della preparazione della sostanza in esame;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame;
- criteri di selezione della via di somministrazione;
- metodi di misurazione della tossicità animale, compresi, se disponibili, analisi istopatologiche o ematologiche e la frequenza con cui è stato misurato il peso corporeo e sono state realizzate osservazioni sugli animali;
- metodi atti a verificare che la sostanza in esame ha raggiunto il tessuto bersaglio o la circolazione sanguigna, se i risultati sono negativi;
- dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;
- dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua.
- descrizione dettagliata dei tempi necessari per il trattamento e campionamento e giustificazione delle scelte;

- metodo di sacrificio;
- procedure di isolamento e di conservazione dei tessuti;
- metodi di isolamento del DNA genomico dei roditori, con recupero del transgene del DNA genomico e trasferimento del DNA transgenico verso un ospite batterico;
- fonte e numero del lotto di tutte le cellule, materiali e reagenti (se del caso);
- metodi di enumerazione dei mutanti;
- metodi di analisi molecolare dei mutanti e loro utilizzo per correggere la clonalità e/o calcolare le frequenze delle mutazioni, se del caso.

Risultati:

- condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;
- peso corporeo e peso degli organi, dopo il sacrificio;
- per ciascun tessuto/animale, valutazione del numero di mutanti, del numero di placche o colonie, frequenza dei mutanti;
- per ciascun gruppo di tessuti/animali, numero di reazioni all'impaccamento per campione di DNA, numero totale di mutanti, frequenza media dei mutanti, deviazione standard;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- per ciascun tessuto/animale, numero di mutanti indipendenti e frequenza media di mutazione, nei casi in cui sia stata condotta un'analisi molecolare delle mutazioni;
- dati sui controlli negativi storici e concomitanti, con intervalli, medie e deviazioni standard;
- dati relativi ai controlli positivi concomitanti (o ai controlli positivi del DNA non concomitanti);
- determinazioni analitiche se disponibili (ad esempio, concentrazioni del DNA utilizzate nell'impaccamento, dati del sequenziamento del DNA);
- analisi statistiche e metodi applicati.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

- (1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), "Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra", *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), "A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement", *Mutation Res.*, 518: 107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), "Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations" *Nature*, 377(6550): 657-659
- (4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), "Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246-255.
- (5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), "Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency", *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405-413.
- (6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), "Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens", *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.
- (7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), "Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice", *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

- (8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), "Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells", *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.
- (9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), "Bayesian Analysis of Mutational Spectra", *Genetics*, 156: 1411-1418.
- (10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), "Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971-7975.
- (11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), "A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host", *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer", *Mutation Res.*, 543: 125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update", *Mutation Res.*, **705: 96-106**.
- (14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), "Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™-Mouse Mutagenicity Assays", *Mutagenesis*, 13(3): 249-255.
- (15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.
- (16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), "Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.
- (17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), "Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073-9078.
- (18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), "The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing", *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212-218.
- (19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), "Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis", *Carcinogenesis*, 29(4): 772-778.
- (20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), "A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi — and 6-thioguanine Selections", *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465-470.
- (21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), "Spi - Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9-15.
- (22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), "Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays", *Mutation Res.*, 455(1-2): 191-215.
- (23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
- (25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), "Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay", *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231-245.
- (26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks,... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), "Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study", *Mutation. Res.*, 388(2-3): 249-289.
- (27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), "Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays", *Mutation. Res.* 598: 164-193.

- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), "Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers", *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.
 - (29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Mutation Res.*, 540: 141-151.
 - (30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), "Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations in vivo" in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, pagg. 391-410.
 - (31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), "A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells", *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
 - (32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
 - (33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.
 - (34) Clermont, Y. (1972), "Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal". *Physiol. REV* 52 198-236.
 - (35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), "The Epididymis", in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R. G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, pagg. 1071-1148.
 - (36) Russell, L.B. (2004), "Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse", *Genetica*, 122: 25-36.
-

Appendice

DEFINIZIONI

Capside: guscio proteinico che circonda una particella virale.

Concatenamero: lunga biomolecola continua composta da multiple copie identiche che si ripetono in serie.

Delezione: mutazione in cui il genoma perde uno o più nucleotidi (sequenziali).

Efficienza dell'impaccamento: efficienza con cui i batteriofagi impaccati sono ritrovati nell'ospite batterico.

Elettroporazione: invio di impulsi di corrente elettrica per aumentare la permeabilità delle membrane cellulari.

Espansione clonale: produzione multipla di cellule a partire da una singola cellula (mutante).

Gene endogeno: gene che ha origine nel genoma.

Gene neutrale: gene non soggetto a pressioni della selezione positiva o negativa.

Gene reporter: gene il cui prodotto (gene mutante) è facilmente individuabile.

Grandi delezioni: delezioni del DNA dell'ordine di grandezza superiore a diversi kilobasi (che sono effettivamente individuate con i saggi di selezione del gene *Spi⁻* e del plasmide *lacZ*).

Impaccamento: sintesi di particelle fagiche infettive a partire da una preparazione di capsidi e code proteiche e di un concatnamero di molecole di DNA di fagi. Tecnica comunemente utilizzata per introdurre DNA clonato in un vettore lambda (separato da siti *cos*) all'interno di particelle lambda infettive.

Inserimento: aggiunta di una o più coppie di basi nucleotidi nella sequenza di DNA.

Jackpot: numero elevato di mutanti generato mediante espansione clonale da una singola mutazione.

Ligazione: formazione di un legame covalente tra due segmenti di molecole di DNA mediante DNA ligasi.

Mitogeno: qualsiasi sostanza che stimola la mitosi (cioè la divisione del nucleo cellulare).

Mutazione per spostamento del sistema di lettura: mutazione genetica consistente nell'inserimento o nella delezione di un numero di nucleotidi diverso da tre o da un multiplo di tre all'interno di una sequenza di DNA che codifica una proteina/un peptide.

Mutazione puntiforme: termine generale che indica una mutazione che interessa solo una piccola sequenza del DNA e che può consistere in piccoli inserimenti, delezioni e sostituzioni di coppie di basi.

Periodo di campionamento: periodo che inizia alla fine del periodo, precedente al sacrificio dell'animale, durante il quale la sostanza non è somministrata e le lesioni del DNA non riparate si fissano in forma di mutazioni stabili.

Periodo di somministrazione: periodo totale durante il quale un animale è sottoposto a somministrazione della sostanza in esame.

Selezione positiva: metodo che consente unicamente ai mutanti di sopravvivere.

Sito *cos*: segmento di DNA a filamento singolo con 12 nucleotidi che si trova ad entrambe le estremità di un genoma a doppio filamento del batteriofago lambda.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Sostanza in esame: qualsiasi sostanza o composto sottoposto a test usando il presente metodo di prova.

Sostituzione di coppie di basi: tipo di mutazione che provoca la sostituzione di una singola base nucleotidica del DNA con un'altra base nucleotidica del DNA.

Transgenico: indicante, o relativo a, un organismo il cui genoma è stato modificato con l'introduzione di uno o più geni di un'altra specie.

Unità formante colonie (cfu): unità di misura per il conteggio delle colonie di batteri vitali.

Unità formante placche (pfu): unità di misura per il conteggio dei batteriofagi vitali.

Variazione extra binomiale: variabilità nelle stime ripetute di una proporzione di popolazione maggiore di quanto ci si potrebbe aspettare se la popolazione avesse una distribuzione binomiale.

Vettore bifunzionale: un vettore costruito in modo tale da essere capace di replicarsi in due diversi tipi di cellula ospite; conseguentemente, il DNA inserito in un vettore bifunzionale può essere testato o manipolato in due diversi tipi di cellule o due diversi organismi.»
