

PARTE B: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA TOSSICITÀ E DEGLI ALTRI EFFETTI SULLA SALUTE

INTRODUZIONE GENERALE: PARTE B

A. NOTA ESPLICATIVA

Ai fini della presente Introduzione vale la seguente numerazione:

B.15 Mutazione genetica: *Saccharomyces cerevisiae*

B.16 Ricombinazione mitotica: *Saccharomyces cerevisiae*

B.17 Cellule di mammifero in vitro: saggio di mutazione genica

B.18 Danno e riparazione del DNA - sintesi non programmata del DNA - cellule di mammifero in vitro

B.19 Saggio degli scambi tra cromatidi fratelli in vitro

B.20 Saggio dei letali recessivi legati al sesso: *Drosophila melanogaster*

B.21 Saggio in vitro di trasformazione di cellule di mammifero

B.22 Saggio dei letali dominanti nei roditori

B.23 Test di aberrazione cromosomica sugli spermatogoni di mammifero

B.24 Saggio delle macchie (spot test) nel topo

B.25 Traslocazioni ereditabili nel topo

B.26 Saggio di tossicità orale subcronica: somministrazione orale ripetuta di dosi per 90 giorni usando specie di roditori

B.27 Saggio di tossicità orale subcronica: somministrazione orale ripetuta di dosi per 90 giorni usando specie di non roditori

B.28 Studio di tossicità cutanea subcronica: somministrazione cutanea ripetuta di dosi per 90 giorni usando specie di roditori

B.29 Studio di tossicità inalatoria subcronica: somministrazione inalatoria ripetuta di dosi per 90 giorni usando specie di roditori

B.30 Saggio di tossicità orale cronica

B.31 Saggio di teratogenesi - roditori e non-roditori

B.32 Saggio di cancerogenesi

B.33 Saggio combinato di tossicità cronica/cancerogenesi

B.34 Saggio di tossicità sulla riproduzione su una generazione

B.35 Saggio di tossicità sulla riproduzione su due generazioni

B.36 Tossicocinetica

B. DEFINIZIONI GENERALI DEI TERMINI UTILIZZATI NEI METODI DI SAGGIO ILLUSTRATI NEL PRESENTE ALLEGATO

i) La tossicità acuta comprende gli effetti avversi che si verificano entro un dato tempo (in genere 14 giorni) dalla somministrazione di una singola dose di sostanza.

ii) La tossicità evidente è un termine generale che descrive chiari segni di tossicità risultanti dalla somministrazione della sostanza in esame. Tali segni devono essere sufficienti per consentire una valutazione dei rischi e tali che un aumento della dose somministrata sia suscettibile di produrre effetti tossici gravi ed eventualmente letali.

iii) La dose e la quantità di sostanza somministrata. Essa viene espressa in termini di peso (grammi o milligrammi) o peso di sostanza saggiata per unità di peso dell'animale usato per il saggio (p. es., milligrammi per chilogrammo di peso corporeo), o ancora concentrazione alimentare costante (parti per milione o milligrammi per chilogrammo di alimento).

iv) La dose discriminante è il maggiore dei quattro livelli di dosaggio fisso che possono essere somministrati senza cagionare mortalità in relazione con la sostanza saggiata (compresa la mortalità per eutanasia).

v) La posologia è un termine generico che designa la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

vi) La DL50 (dose letale media) è la dose singola di una sostanza, valutata statisticamente, che si prevede causi la morte del 50 % degli animali trattati. Il valore della DL50 viene espresso in

termini di peso della sostanza saggiata per unità di peso dell'animale usato per il saggio (milligrammi per chilogrammo).

vii) La CL50 (concentrazione letale media) è la concentrazione di una sostanza, valutata statisticamente, che si può prevedere causi la morte durante l'esposizione o entro un determinato tempo, consecutivo all'esposizione, del 50 % degli animali esposti per un determinato periodo. Il valore della CL50 viene espresso in termini di peso della sostanza in esame per volume standard di aria (milligrammi per litro).

viii) NOAEL è l'abbreviazione dell'inglese "no observed adverse effect level" e designa la dose o il livello di esposizione massimo per i quali non siano stati osservati effetti avversi.

ix) La tossicità subcronica da somministrazione ripetuta comprende gli effetti avversi cagionati negli animali dalla somministrazione ripetuta quotidianamente di una dose o da una esposizione ripetuta quotidianamente a una sostanza chimica per una breve parte della loro prevista durata di vita.

x) La dose massima tollerata (DMT) è il livello massimo di dose che provoca sintomi di tossicità in animali senza avere effetti rilevanti sulla sopravvivenza, in relazione al saggio in cui viene usata.

xi) L'irritazione cutanea è la produzione di alterazioni infiammatorie reversibili nella cute a seguito dell'applicazione della sostanza in esame.

xii) L'irritazione oculare è la produzione di alterazioni reversibili nell'occhio a seguito dell'applicazione della sostanza in esame sulla superficie anteriore dell'occhio.

xiii) La sensibilizzazione cutanea (dermatite allergica da contatto) è una reazione cutanea ad una sostanza mediata da fattori immunologici.

xiv) La corrosione del derma è la produzione di lesioni irreversibili dei tessuti cutanei a seguito dell'applicazione della sostanza in esame per un periodo compreso tra 3 minuti e 4 ore.

xv) La tossicocinetica è lo studio dell'assorbimento, della distribuzione, del metabolismo o dell'escrezione delle sostanze in esame.

xvi) L'assorbimento corrisponde al/ai processo/i per cui una sostanza somministrata penetra nell'organismo.

xvii) L'escrezione corrisponde al/ai processo/i per cui una sostanza somministrata e/o i suoi metaboliti vengono eliminati dall'organismo.

xviii) La distribuzione corrisponde al/ai processo/i per cui la sostanza assorbita e/o i suoi metaboliti si distribuiscono nell'organismo.

xix) Il metabolismo corrisponde al/ai processo/i per cui le sostanze somministrate subiscono nell'organismo reazioni enzimatiche o non enzimatiche che ne modificano la struttura.

B.1 Tossicità acuta - tossicità a dose ripetuta / tossicità cronica e subcronica

Diversi saggi (metodi da B.1 a B.5) consentono di valutare gli effetti tossici acuti e la tossicità specifica o sistemica di una sostanza; essi forniscono un'indicazione preliminare sulla tossicità con la somministrazione di una singola dose.

In funzione della tossicità di una sostanza, può essere opportuno effettuare un saggio limite come approccio al saggio di DL50; negli studi per inalazione non è specificato alcun saggio limite, in quanto non è stato possibile definire un valore limite di esposizione singola per inalazione.

La preferenza dovrà essere accordata ai metodi che facciano il minore ricorso possibile agli animali e riducano al massimo le sofferenze ad essi cagionate, quali, per esempio, il metodo a dose fissa (metodo B.1 bis) e il metodo della classe di tossicità acuta (metodo B.1 tris). Per i saggi di livello 1, le conclusioni del primo studio possono essere integrate da uno studio su una seconda specie. In questo caso potrà essere utilizzato un metodo di saggi standard o il metodo potrà essere adattato per un numero minore di animali.

Il saggio di tossicità a dose ripetuta (metodi B.7, B.8 e B.9) consente di valutare gli effetti tossici derivanti da un'esposizione ripetuta. È necessaria un'accurata osservazione clinica degli animali per ottenere il maggior numero possibile di informazioni. Tali saggi sono finalizzati all'individuazione degli organi bersaglio della tossicità e alla determinazione delle dosi tossiche e

non tossiche. Negli studi a lungo termine si potrà rendere necessaria un'analisi più approfondita di questi aspetti (metodi B.26 - B.30 e B.33).

B.II Mutagenicità - genotossicità

La mutagenicità designa l'induzione di modificazioni permanenti e trasmissibili nella quantità o nella struttura del materiale genetico delle cellule o degli organismi. Tali modificazioni o "mutazioni" possono interessare un singolo gene o segmenti di un gene, un blocco di geni o interi cromosomi. Gli effetti su interi cromosomi possono essere strutturali e/o numerici. L'attività mutagena di una sostanza viene valutata attraverso saggi in vitro su batteri per le mutazioni genetiche (puntiformi) (metodi B.13/14) e/o su cellule di mammifero per le aberrazioni strutturali cromosomiche (metodo B.10).

Sono accettabili anche procedure in vivo, quali il saggio del micronucleo (metodo B.12) o il saggio dell'analisi metafisica delle cellule di midollo osseo (metodo B.11). In assenza di controindicazioni sono tuttavia decisamente da preferire i metodi in vitro.

Per maggiori volumi di produzione e/o per l'esecuzione o la messa a punto di una valutazione dei rischi possono essere necessari studi complementari intesi a determinare con precisione il potenziale mutageno di una sostanza o a individuarne l'eventuale cancerogenicità. Tali studi possono essere utilizzati per diversi scopi: confermare i risultati ottenuti nei saggi di base, esaminare parametri non contemplati nei saggi di base, avviare o ampliare saggi in vivo.

A questo scopo, i metodi da B.15 a B.25 utilizzano sistemi eucarioti sia in vivo che in vitro e comprendono un'ampia gamma di parametri biologici. Tali saggi forniscono informazioni sulle mutazioni puntiformi e su altri parametri in organismi più complessi rispetto ai batteri utilizzati nei saggi di base.

In linea generale, qualora si decida la realizzazione di un programma complementare di studi di mutagenicità, questo dovrà essere formulato in modo da apportare informazioni complementari pertinenti sul potenziale mutageno e/o cancerogeno della sostanza in esame.

La scelta del saggio più appropriato al caso in esame dipende da tutta una serie di fattori, tra cui le caratteristiche fisico-chimiche della sostanza, i risultati dei primi saggi batterici e citogenetici, il profilo metabolico della sostanza, i risultati di altri studi di tossicità e gli usi noti della sostanza. Data la molteplicità dei fattori da prendere in esame, è sconsigliabile applicare criteri troppo rigidi nella scelta dei saggi da eseguire.

Alcuni principi generali sui metodi di saggio da adottare vengono fissati dalla direttiva 93/67/CEE; il documento tecnico di orientamento sulla valutazione dei rischi definisce invece precise strategie a questo riguardo, pur ammettendo una certa flessibilità e adattabilità in funzione delle circostanze specifiche.

Qui di seguito vengono elencati i metodi di saggio complementari, raggruppati in funzione del loro principale parametro genetico:

Studi sulle mutazioni geniche (puntiformi)

- a) Studi sulla mutazione in avanti o sulla mutazione inversa usando microrganismi eucarioti (*Saccharomyces cerevisiae*) (metodo B.15)
- b) Studi in vitro sulla mutazione in avanti di cellule di mammifero (metodo B.17)
- c) Saggio dei letali recessivi legati al sesso su *Drosophila melanogaster* (metodo B.20)
- d) Saggio di mutazione somatica cellulare in vivo, saggio delle macchie nel topo (metodo B.24)

Studi sulle aberrazioni cromosomiche

- a) Studi citogenetici in vivo nei mammiferi; può essere opportuno procedere ad un'analisi metafisica in vivo delle cellule di midollo osseo, qualora essa non sia stata effettuata nel corso della valutazione iniziale (metodo B.11). È inoltre possibile studiare la citogenetica delle cellule germinali in vivo (metodo B.23)
- b) Studi citogenetici in vitro su cellule di mammifero, se non effettuati nel corso della valutazione iniziale (metodo B.10)
- c) Studi dei letali dominanti nei roditori (metodo B.22)
- d) Saggio di traslocazione ereditabile nel topo (metodo B.25)

Effetti genotossici - effetti sul DNA

La genotossicità, che designa effetti potenzialmente nocivi sul materiale genetico non necessariamente associati a mutagenicità, può essere identificata sulla base di danni indotti sul DNA senza evidenza diretta di mutazione. Per questo tipo di indagine possono essere appropriati i metodi elencati qui di seguito, che utilizzano microrganismi eucarioti o cellule di mammifero:

- a) Ricombinazione mitotica su *Saccharomyces cerevisiae* (metodo B.16)
- b) Danno e riparazione del DNA - sintesi non programmata del DNA - cellule di mammifero - in vitro (metodo B.18)
- c) Scambio di cromatidi fratelli in cellule di mammifero - in vitro (metodo B.19)

Metodi alternativi per lo studio del potenziale cancerogeno

Esistono saggi di trasformazione su cellule di mammifero che consentono di determinare la capacità di una sostanza di indurre, in colture cellulari, modificazioni morfologiche e comportamentali che si ritiene possano essere associate ad una trasformazione maligna in vivo (metodo B.21). Possono essere utilizzati un certo numero di tipi cellulari e di criteri di trasformazione.

Valutazione del rischio di effetti ereditabili nei mammiferi

Esistono metodi atti a determinare gli effetti ereditabili indotti nei mammiferi da mutazioni genetiche (puntiformi), come il saggio dei loci specifici nel topo, che consente di misurare la mutazione della cellula germinale nella prima generazione (non illustrato nel presente allegato), o a determinare aberrazioni cromosomiche, come la prova di traslocazione ereditabile nel topo (metodo B.25). Tali metodi possono essere utilizzati per la valutazione del possibile rischio genetico di una sostanza per l'uomo. Tuttavia, data la loro complessità e l'elevato numero di animali richiesti, soprattutto per il saggio dei loci specifici, studi di questo tipo dovranno essere effettuati solo se strettamente necessari.

B.III Cancerogenicità

Le sostanze chimiche possono essere classificate come agenti cancerogeni genotossici o non genotossici in funzione del meccanismo d'azione presunto.

Gli studi di mutagenicità/genotossicità consentono di effettuare uno screening preliminare per la determinazione del potenziale cancerogeno genotossico di una sostanza. Ulteriori informazioni possono essere fornite dai saggi di tossicità a dose ripetuta, di tossicità subcronica o cronica. Il saggio di tossicità a dose ripetuta (metodo B.7) e gli studi a lungo termine a dose ripetuta comportano una valutazione delle modificazioni istopatologiche osservate, quale per esempio l'iperplasia di determinati tessuti. Tali studi, insieme alle informazioni tossicocinetiche, possono contribuire all'identificazione di sostanze chimiche dotate di un potenziale cancerogeno, su cui potranno essere effettuate indagini più approfondite tramite un saggio di cancerogenicità (Metodo B.32) o, in molti casi, uno studio combinato di tossicità cronica e cancerogenicità (Metodo B.33).

B.IV Tossicità per la riproduzione

La tossicità per la riproduzione può esprimersi in diversi modi, per esempio attraverso un'alterazione della funzione o della capacità riproduttiva maschile o femminile, definita come "effetti sulla fertilità", o la comparsa nella prole di effetti avversi non ereditabili, definita come "tossicità per lo sviluppo", concetto in cui rientrano anche la teratogenicità e gli effetti durante l'allattamento.

Per gli studi di teratogenicità, che fanno parte dello screening di tossicità per lo sviluppo, il metodo di saggio (metodo B.31) è sostanzialmente finalizzato alla somministrazione per via orale. In funzione delle caratteristiche fisiche della sostanza in esame o della via probabile di esposizione per l'uomo, è possibile il ricorso alternativo ad altre vie di somministrazione. In tal caso occorre modificare opportunamente il metodo di saggio tenendo conto degli elementi pertinenti dei metodi di saggio su 28 giorni.

Qualora sia necessario uno studio della riproduzione su tre generazioni (fertilità), è possibile utilizzare il metodo descritto per il saggio di riproduzione su due generazioni (metodo B.35)

estendendolo ad una terza.

B.V Neurotossicità

La neurotossicità può esprimersi in modi diversi, per esempio attraverso modificazioni funzionali e/o strutturali e modificazioni biochimiche nel sistema nervoso centrale o periferico. I saggi di tossicità acuta consentono di ottenere una prima indicazione sulla neurotossicità di una sostanza. Il saggio di tossicità a dose ripetuta (metodo B.7) comprende una valutazione degli effetti neurotossici; l'osservazione clinica degli animali deve essere particolarmente accurata per poter ottenere il maggior numero possibile di informazioni. Scopo di questo metodo è consentire l'individuazione di sostanze chimiche dotate di un potenziale neurotossico, che possono necessitare di indagini più approfondite al riguardo. Inoltre, è importante valutare la facoltà di una sostanza di indurre effetti neurotossici specifici che potrebbero non essere evidenziati da altri studi di tossicità. Per esempio, è stato osservato che alcune sostanze organofosforiche producono effetti neurotossici ritardati che possono essere valutati con i metodi B.37 e B.38, previa esposizione a dose singola o a dose ripetuta.

B.VI Immunotossicità

L'immunotossicità può esprimersi in diversi modi, per esempio l'immunosoppressione e/o il rafforzamento della risposta immunitaria, che dà luogo ad ipersensibilità o ad autoimmunità indotta. Il saggio di tossicità a dose ripetuta (metodo B.7) prevede una valutazione degli effetti immunotossici. Tale metodo è inteso a consentire l'identificazione di sostanze chimiche dotate di un potenziale immunotossico, che possono necessitare di indagini più approfondite al riguardo.

B.VII Tossicocinetica

Gli studi di tossicocinetica sono finalizzati all'interpretazione e alla valutazione dei dati di tossicità. Essi hanno lo scopo di chiarire determinati aspetti particolari della tossicità della sostanza chimica in esame e i risultati ottenuti possono essere di aiuto nella progettazione di ulteriori studi. Non si considera che sia necessario determinare la totalità dei parametri in ciascun caso. La sequenza completa degli studi tossicocinetici (assorbimento, escrezione, distribuzione e metabolismo) sarà necessaria solo in rari casi. Per taluni composti potrebbero essere opportune modifiche di detta sequenza, ovvero potrebbe essere sufficiente uno studio con dose unica (metodo B.36).

Le informazioni sulla struttura chimica (SAR, cioè structure activity relationship) e sulle proprietà fisico-chimiche possono anche fornire indicazioni sulle caratteristiche di assorbimento attraverso la via di somministrazione prevista e le possibilità metaboliche e di distribuzione nel tessuto. Informazioni sui parametri tossicocinetici possono inoltre provenire da precedenti studi di tossicità e di tossicocinetica.

C. CARATTERIZZAZIONE DELLA SOSTANZA IN ESAME

Prima dell'inizio di qualsiasi studio di tossicità occorre conoscere la composizione della sostanza in esame, incluse le impurità principali e le proprietà fisico-chimiche pertinenti, compresa la stabilità.

Le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame forniscono informazioni importanti per la scelta della via di somministrazione, per la progettazione dei vari studi e per il trattamento e la conservazione della sostanza in esame.

L'elaborazione di un metodo analitico per la determinazione qualitativa e quantitativa della sostanza in esame (comprese, se possibile, le principali impurità) nel mezzo di dosaggio e nel materiale biologico deve precedere l'inizio dello studio.

Tutte le informazioni relative all'identificazione, alle proprietà fisico-chimiche, alla purezza e al comportamento della sostanza devono essere riportate nella relazione del saggio.

D. CURA DEGLI ANIMALI

Nei saggi di tossicità è indispensabile esercitare un rigoroso controllo delle condizioni ambientali e utilizzare tecniche adeguate per la cura degli animali.

(i) Condizioni di alloggiamento

Le condizioni ambientali nei locali o nei recinti degli animali da laboratorio devono essere

appropriate per le specie sperimentali. Per ratti, topi e porcellini d'India è indicata una temperatura ambiente di $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ con un'umidità relativa del 30-70 %. Per i conigli, la temperatura deve essere di $20 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ con un'umidità relativa del 30-70 %.

Talune tecniche sperimentali sono particolarmente sensibili agli effetti della temperatura e, in tali casi, la descrizione del metodo di saggio comprende indicazioni precise sulle condizioni adeguate. In tutti gli studi di tossicità, la temperatura e l'umidità devono essere controllate, registrate e riportate nella relazione finale dello studio.

L'illuminazione deve essere artificiale ed alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Le condizioni di illuminazione devono essere dettagliatamente registrate e riportate nella relazione finale dello studio.

Salvo nel caso in cui venga diversamente specificato nel metodo, gli animali dovranno essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso. In questo caso il numero degli animali non dovrà essere superiore a cinque.

Nelle relazioni sugli esperimenti effettuati su animali dovranno essere indicati il tipo di gabbie utilizzate e il numero di animali alloggiati in ogni gabbia sia durante l'esposizione alla sostanza chimica che durante tutto il periodo successivo di osservazione.

(ii) Condizioni di alimentazione

La dieta deve soddisfare tutte le esigenze nutrizionali della specie utilizzata per il saggio.

Qualora le sostanze in esame vengano somministrate agli animali nella loro dieta, il valore nutrizionale degli alimenti potrebbe essere ridotto per effetto dell'interazione tra la sostanza ed un costituente dietetico. Nell'interpretazione dei risultati dei saggi si dovrà tener conto di questa possibilità. Gli animali potranno essere nutriti con diete convenzionali da laboratorio ed abbeverati con acqua a sazietà. La scelta della dieta potrà essere condizionata dalla necessità di garantire un apporto adeguato della sostanza in esame, qualora essa venga somministrata con gli alimenti.

I contaminanti dietetici suscettibili di influenzare la tossicità non dovrebbero essere presenti in condizioni tali da causare interferenze.

E. BENESSERE DEGLI ANIMALI

Nell'elaborazione dei metodi sperimentali si è tenuto in debita considerazione il benessere degli animali. Citiamo brevemente qui di seguito alcuni esempi, benché l'elenco sia lungi dall'essere completo. Per le espressioni e/o le condizioni esatte, si farà riferimento al testo dei metodi:

- Per la determinazione della tossicità orale acuta esistono due metodi alternativi: il "metodo a dose fissa" e il "metodo della classe di tossicità acuta". Il "metodo a dose fissa" non utilizza la morte come parametro specifico di valutazione e richiede un minor numero di animali. Il "metodo della classe di tossicità acuta" utilizza in media il 70 % di animali in meno rispetto al metodo B.1 per la tossicità acuta orale. Entrambi questi metodi alternativi comportano minor sofferenza e dolore fisico rispetto alla metodologia classica.

- Il numero degli animali utilizzati è ridotto al minimo scientificamente accettabile: solo 5 animali di egual sesso vengono trattati per ogni livello di dosaggio per i metodi B.1 e B.3; solo 10 animali (e solo 5 per il gruppo di controllo negativo) vengono utilizzati per determinare la sensibilizzazione cutanea con il saggio di massimizzazione nel porcellino d'India (Guinea-Pig Maximisation Test, metodo B.6); anche il numero di animali necessari per il controllo positivo negli studi di mutagenicità in vivo è ridotto (metodi B.11 e B.12).

- Le sofferenze inflitte agli animali durante i saggi sono ridotte al minimo: gli animali che presentano segni di sofferenza gravi e persistenti dovranno essere sottoposti ad eutanasia; le sostanze in esame non dovranno essere somministrate in dosaggi suscettibili di cagionare sofferenze gravi per effetto delle loro proprietà corrosive o irritanti (metodi B.1, B.2 e B.3).

- L'introduzione di saggi limite consente di evitare la somministrazione di dosi inutilmente elevate, non solo nei saggi di tossicità acuta (metodi B.1, B.2 e B.3), ma anche nei saggi di mutagenicità in vivo (metodi B.11 e B.12).

- Una strategia per la determinazione del grado di irritabilità consente di non effettuare un saggio

o di limitarlo ad un solo animale laddove si disponga di sufficienti elementi scientifici giustificativi.

Tale evidenza scientifica può essere data dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza, dai risultati di saggi precedenti o dai risultati di saggi in vitro debitamente confermati. Per esempio, qualora in uno studio di tossicità cutanea acuta con somministrazione di una dose limite (metodo B.3) non siano stati osservati segni di irritazione del derma, può non essere necessario effettuare ulteriori prove di irritazione cutanea (metodo B.4); le sostanze rivelatesi effettivamente corrosive o fortemente irritanti per la pelle nell'ambito di uno studio di irritazione cutanea (metodo B.4) non dovranno essere ulteriormente saggiate per l'irritazione oculare (metodo B.5).

F. METODI ALTERNATIVI

Uno degli obiettivi scientifici dell'Unione europea è di sviluppare e collaudare tecniche alternative che consentano di ottenere lo stesso livello di informazioni degli attuali esperimenti su animali, riducendo tuttavia il numero di animali utilizzati e le sofferenze ad essi inflitte o evitando del tutto il ricorso agli animali.

Non appena perfezionati, tali metodi dovranno costituire, ove possibile, la scelta d'elezione per gli studi miranti alla caratterizzazione dei rischi e alla conseguente classificazione ed etichettatura delle sostanze in funzione dei rischi intrinseci.

G. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Nella valutazione ed interpretazione dei saggi occorre tener conto dei limiti entro i quali i risultati di studi su animali e in vitro possono essere estrapolati direttamente all'uomo; laddove si abbia evidenza di effetti avversi per l'uomo, questa potrà essere utilizzata per confermare i risultati sperimentali.

Tali risultati possono servire per la classificazione e l'etichettatura di sostanze nuove o già esistenti per quanto riguarda gli effetti sulla salute dell'uomo, sulla base delle loro proprietà intrinseche, identificate e quantificate da tali metodi. I criteri per la classificazione e l'etichettatura di cui all'allegato VI fanno riferimento anche ai parametri previsti dai protocolli sperimentali riportati nei presenti metodi di saggio.

Tali risultati possono inoltre essere utilizzati per studi di valutazione dei rischi di sostanze chimiche nuove o già esistenti; adeguate strategie sperimentali sono indicate a tale scopo nei corrispondenti documenti orientativi.

H. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

La maggior parte di detti metodi è stata messa a punto nell'ambito del programma per la definizione di linee guida elaborato dall'OCSE in materia di saggi. Essi dovranno essere applicati in conformità con i principi delle buone pratiche di laboratorio allo scopo di garantire il più possibile il "reciproco riconoscimento dei dati".

Ulteriori informazioni sono reperibili nei riferimenti citati nelle linee guida dell'OCSE e nell'ampia letteratura esistente in materia

B. 1 tris

TOSSICITÀ ACUTA PER VIA ORALE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

1. METODO

1.1. Introduzione

Il metodo della classe di tossicità acuta fornisce informazioni per la valutazione e la classificazione dei rischi.

Il metodo utilizza tre dosi fisse, adeguatamente distinte in modo da consentire la classificazione della sostanza in base ai risultati dello studio. Inoltre la procedura descritta prevede la possibilità di scegliere tre dosi fisse supplementari, che possono essere utilizzate quale opzione alternativa in determinate fasi decisionali o per l'esecuzione di ulteriori esperimenti. L'utilizzo di (una di dette) dosi supplementari può essere previsto nei casi in cui sia auspicabile o necessaria una valutazione più accurata.

Il metodo, che utilizza dosi iniziali definite, non ha lo scopo di determinare una LD₅₀ precisa, ma è inteso a stabilire un range di esposizione potenzialmente letale. La morte di una certa percentuale di animali costituisce infatti il principale parametro preso in esame dal saggio in questione. I risultati del test dovrebbero consentire una classificazione secondo i criteri enunciati nell'allegato VI. Dato l'approccio sequenziale del metodo, la durata del saggio potrebbe essere superiore a quella della procedura descritta al punto B.1. Il principale vantaggio di questo metodo è che esso richiede un minor numero di animali rispetto al metodo di tossicità orale acuta (B.1) e al metodo alternativo a dose fissa (B.1 bis).

Vedi anche introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Principio del metodo di saggio

La sostanza viene somministrata per via orale ad un gruppo di animali da laboratorio in una delle dosi definite. Essa viene saggiata secondo una procedura composta da diverse fasi, per ciascuna delle quali vengono utilizzati tre animali dello stesso sesso. Non è necessario eseguire uno studio di osservazione preliminare. Il fatto che in una fase si abbia o meno mortalità degli animali trattati indotta dalla sostanza determinerà la fase successiva:

- il saggio verrà sospeso
- la fase successiva sarà effettuata con lo stesso dosaggio, ma con animali dell'altro sesso
- la fase successiva sarà effettuata con il livello di dosaggio immediatamente superiore o inferiore.

1.4. Descrizione del metodo di saggio

1.4.1. Preparazioni

Animali adulti giovani e sani vengono scelti in modo casuale, marchiati per consentirne l'individuazione e mantenuti nelle loro gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio, in modo da potersi acclimatare alle condizioni di laboratorio. Gli animali possono essere raggruppati in funzione del sesso e del dosaggio, ma il numero di animali per gabbia non deve essere tale da impedire la corretta osservazione di ogni esemplare.

La sostanza da saggiare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o cannula per intubazione.

Se necessario, la sostanza da saggiare viene disciolta o sospesa in un veicolo adatto. Ove possibile, si preferirà una soluzione/sospensione acquosa, o, come seconda alternativa, una soluzione/emulsione in olio (per esempio olio di mais), o ancora, infine, una soluzione in altri veicoli. Per i veicoli non acquosi, le caratteristiche di tossicità del veicolo dovranno essere note o, in caso contrario, determinate prima del saggio.

Gli animali dovranno essere tenuti a digiuno prima della somministrazione della sostanza (a partire dalla sera precedente per il ratto e tre-quattro ore prima per il topo), ma potranno continuare ad essere abbeverati.

1.4.2. *Condizioni sperimentali*

1.4.2.1. *Animali da esperimento*

Salvo controindicazione, il ratto è la specie d'elezione. Le femmine dovranno essere nullipare e non gravide.

All'inizio dello studio, la variazione di peso degli animali dovrà essere minima e non essere superiore al ± 20 per cento del peso medio per ogni sesso.

1.4.2.2. *Numero e sesso*

Per ogni fase del saggio vengono utilizzati tre animali dello stesso sesso. Nella fase iniziale può essere utilizzato uno qualsiasi dei due sessi.

1.4.2.3. *Livelli di dosaggio*

Il livello iniziale di dosaggio sarà una delle tre dosi fisse, vale a dire 25, 200 e 2 000 mg/kg di peso corporeo. La dose iniziale dovrà essere quella più suscettibile di cagionare la morte di almeno una parte degli animali trattati. In funzione della dose iniziale si utilizzerà uno degli schemi descritti nell'allegato 1.

Per la scelta del sesso e della dose iniziale dovranno essere utilizzate tutte le informazioni disponibili, comprese quelle concernenti le relazioni struttura-attività. Qualora, alla luce di tali informazioni, la mortalità risulti improbabile al livello massimo di dosaggio (2 000 mg/kg di peso corporeo), si potrà fare ricorso ad un saggio limite. In mancanza di informazioni su una sostanza da saggiare, per il benessere degli animali si raccomanda l'uso della dose iniziale di 200 mg/kg di peso corporeo.

In alcuni casi può essere opportuno acquisire più informazioni rispetto a quelle fornite dal saggio che prevede la somministrazione di tre dosi fisse di 25, 200 e 2 000 mg/kg di peso corporeo. In questa eventualità si potrà proseguire lo studio somministrando dosi supplementari fisse rispettivamente di 5, 50 o 500 mg/kg di peso corporeo.

Dovrà essere possibilmente evitata la somministrazione di dosaggi suscettibili di cagionare sofferenze gravi per effetto delle proprietà corrosive o irritanti delle sostanze.

L'intervallo di tempo che intercorre tra il trattamento dei diversi gruppi viene determinato in funzione dell'esordio, della durata e della gravità dei segni di tossicità. Si avrà cura di procedere al trattamento degli animali dell'altro sesso o alla somministrazione della dose successiva in un altro gruppo di animali solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali precedentemente trattati.

1.4.2.4. *Saggio limite*

È possibile eseguire un saggio limite ad un unico livello di dosaggio di 2 000 mg/kg di peso corporeo su tre animali per sesso. Qualora si osservi una mortalità correlata con la sostanza, può essere necessario proseguire il saggio con una dose di 200 mg/kg (o 500 mg/kg) di peso corporeo.

1.4.2.5. *Periodo di osservazione*

Di norma gli animali devono essere tenuti in osservazione per un periodo di 14 giorni, eccetto nel caso in cui sia preferibile escluderli dallo studio e sottoporli ad eutanasia o qualora vengano rinvenuti morti. Tuttavia tale durata non deve essere tassativa. Essa dipenderà dalla natura delle reazioni tossiche, dalla velocità del loro insorgere e dalla durata del periodo di recupero e, se necessario, potrà essere prolungata. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto in caso di insorgenza tardiva. Tutte le osservazioni devono essere registrate su schede individuali per ogni animale.

1.4.3. *Procedimento*

Dopo il periodo di digiuno e prima della somministrazione della sostanza da saggiare, gli animali vengono pesati. A somministrazione avvenuta, il cibo può essere sospeso per altre 3-4 ore. Qualora la stessa dose venga frazionata e somministrata durante un certo periodo di tempo, può essere necessario nutrire e abbeverare gli animali in misura adeguata alla durata del periodo di somministrazione.

Il volume massimo di liquidi somministrabile in un'unica volta dipende dalla taglia dell'animale da esperimento. Nei roditori esso non dovrebbe essere superiore ad 1 ml/100 g di peso corporeo; tuttavia per le soluzioni acquose sono ammessi 2 ml/100 g di peso corporeo. La variabilità del volume di liquidi da somministrare dovrebbe essere ridotta al minimo correggendo la concentrazione in modo che tutti i livelli di dosaggio abbiano un volume costante. Qualora non sia possibile somministrare l'intera quantità con una singola dose, si procederà alla somministrazione ripetuta di piccole frazioni di essa durante un periodo non superiore a 24 ore.

Lo schema procedurale dettagliato è descritto nell'allegato 1.

1.4.3.1. Osservazioni generali

Accurate osservazioni cliniche dovranno essere effettuate almeno due volte nel giorno stesso della somministrazione, o più frequentemente se la reazione degli animali lo richiede, e successivamente almeno una volta al giorno. Gli animali moribondi o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza dovranno essere sottoposti ad eutanasia. In questo caso esse saranno assimilati agli animali andati incontro a morte spontanea durante l'esperimento.

Nel caso di animali sottoposti ad eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso dovrà essere registrato con la massima precisione possibile. Ulteriori osservazioni saranno necessarie qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità. Dette osservazioni comprenderanno le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento. Particolare attenzione sarà rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma.

Tutte le osservazioni saranno sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

1.4.3.2. Peso corporeo

Tutti gli animali saranno pesati poco prima della somministrazione della sostanza da saggiare e almeno una volta alla settimana successivamente. Le variazioni ponderali dovranno essere calcolate e registrate. Al termine del saggio gli animali sopravvissuti saranno pesati prima di essere sottoposti ad eutanasia.

1.4.3.3. Necropsia macroscopica

Tutti gli animali da esperimento, compresi quelli morti durante il saggio o da esso esclusi, dovranno essere sottoposti a necropsia macroscopica. Per ogni animale si registreranno tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti per almeno 24 ore, l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti potrebbe fornire indicazioni utili ed essere quindi opportuno.

2. DATI

Dovranno essere forniti i dati individuali di ciascun animale. Inoltre, tutti i dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo di saggio, il numero di animali utilizzati, il numero di animali recanti segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti ad eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazione del momento della loro comparsa, decorso e reversibilità, e i risultati della necropsia.

Indicazioni generali sull'interpretazione dei risultati ai fini della loro classificazione sono riportate nell'allegato 2.

3. RELAZIONE

Relazione sul saggio

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

Animali da esperimento:

- specie/ceppo;
- condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di alloggiamento, dieta ecc.;
- peso di ciascun animale determinato all'inizio del saggio, con cadenza settimanale nel periodo successivo e al termine del saggio.

Condizioni sperimentali:

- motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame, compresi i volumi di dosaggio e il momento della somministrazione;
- caratteristiche della qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine, origine dell'acqua);
- motivazione della scelta del dosaggio iniziale.

Risultati:

- tabulato dei dati di risposta per sesso e livello di dosaggio per ciascun animale (vale a dire animali recanti segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti);
- momento della comparsa dei segni di tossicità, loro decorso ed eventuale reversibilità per ogni animale;
- risultati della necropsia ed eventuali altri reperti istopatologici per ogni animale.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI**

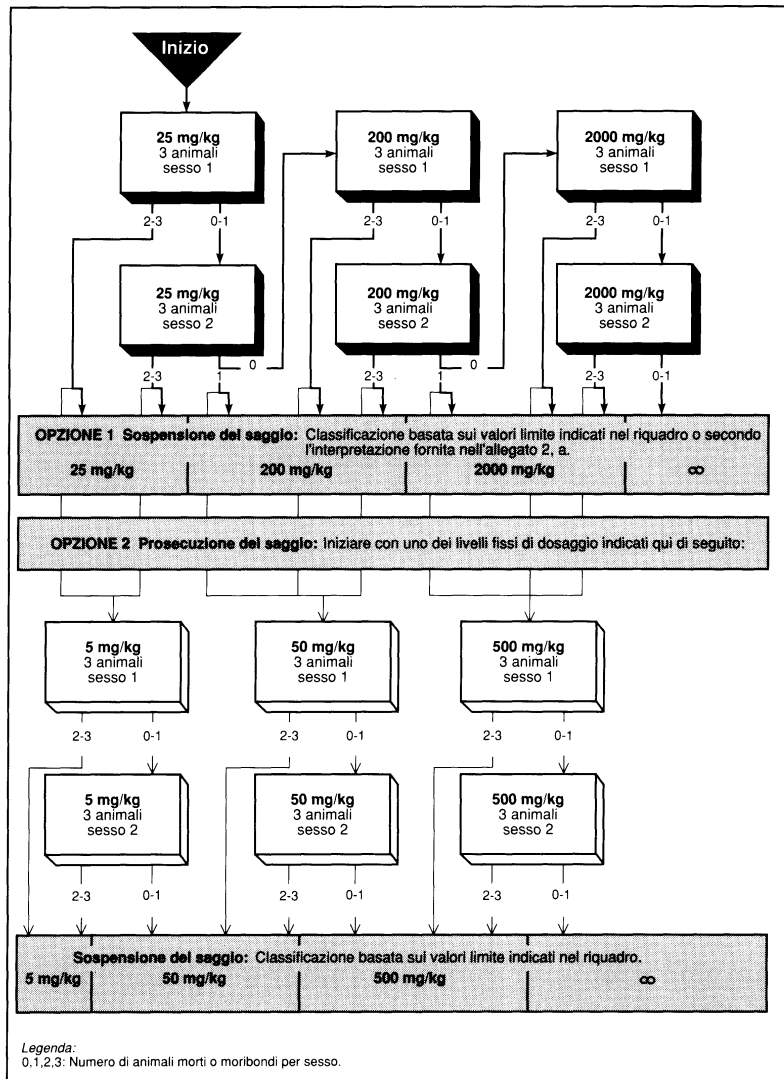
Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 423.

ALLEGATO 1

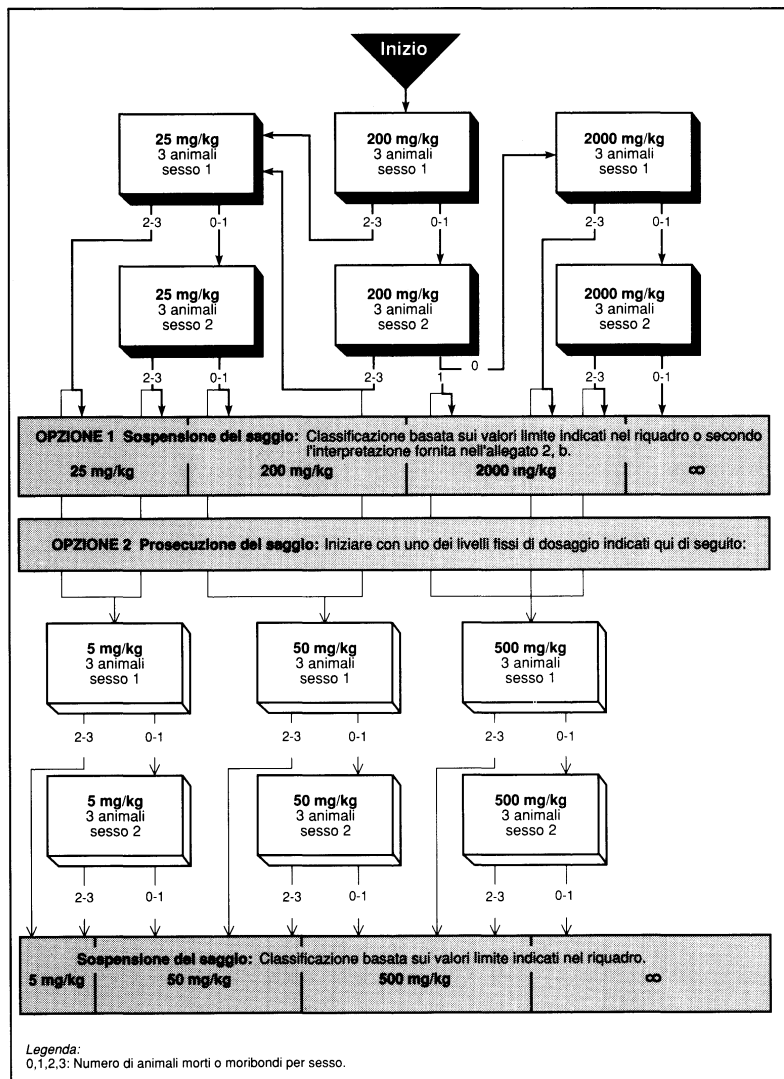
SCHEMA PROCEDURALE

1. Come indicato al paragrafo 1.4.2.3, la dose iniziale dovrà essere quella più suscettibile di cagionare la morte di almeno una parte degli animali trattati. La scelta della dose iniziale sarà effettuata in funzione dei seguenti parametri:
 - dati concernenti le proprietà fisico-chimiche;
 - relazione struttura-attività;
 - tutti i dati forniti da altri saggi di tossicità; e
 - uso previsto della sostanza.
2. Per ogni dose iniziale, gli schemi riportati nel presente allegato definiscono il procedimento da seguire. In funzione del numero di animali morti o sottoposti ad eutanasia, il procedimento da seguire è indicato da frecce.
3. Nel caso in cui alla dose iniziale di 25 o 200 mg/kg di peso corporeo si riscontri il decesso di un solo animale del secondo sesso, di norma non dovranno essere effettuate altre somministrazioni. Tuttavia, qualora gli altri cinque animali non presentino segni di tossicità, al momento dell'autopsia si dovrà prendere in considerazione l'ipotesi che la morte non sia stata cagionata dalla sostanza. In tal caso, si dovrà proseguire l'esperimento con la somministrazione del dosaggio immediatamente superiore.
4. Nel caso in cui alla dose di 2 000 mg/kg di peso corporeo si riscontri il decesso di un animale per sesso, è lecito desumere che la DL_{50} sia superiore a 2 000 mg/kg di peso corporeo. Tuttavia, trattandosi di un risultato borderline, è opportuno osservare attentamente la risposta degli altri due animali per sesso l'eventuale comparsa di segni chiari e marcati di tossicità in detti animali potrebbe infatti condurre ad una classificazione corrispondente ad una DL_{50} uguale o inferiore a 2 000 mg/kg di peso corporeo o giustificare l'esecuzione di ulteriori prove con il medesimo dosaggio.
5. Il procedimento prevede la possibilità di somministrare tre dosi fisse supplementari (opzione 2). Tale opzione può essere utilizzata per selezionare una dose alternativa in una determinata fase decisionale del saggio, o effettuare ulteriori esperimenti una volta ultimato il saggio in questione (opzione 1). Lo schema procedurale dell'opzione 1 è indicato da frecce in grassetto, quello dell'opzione 2 da frecce normali.

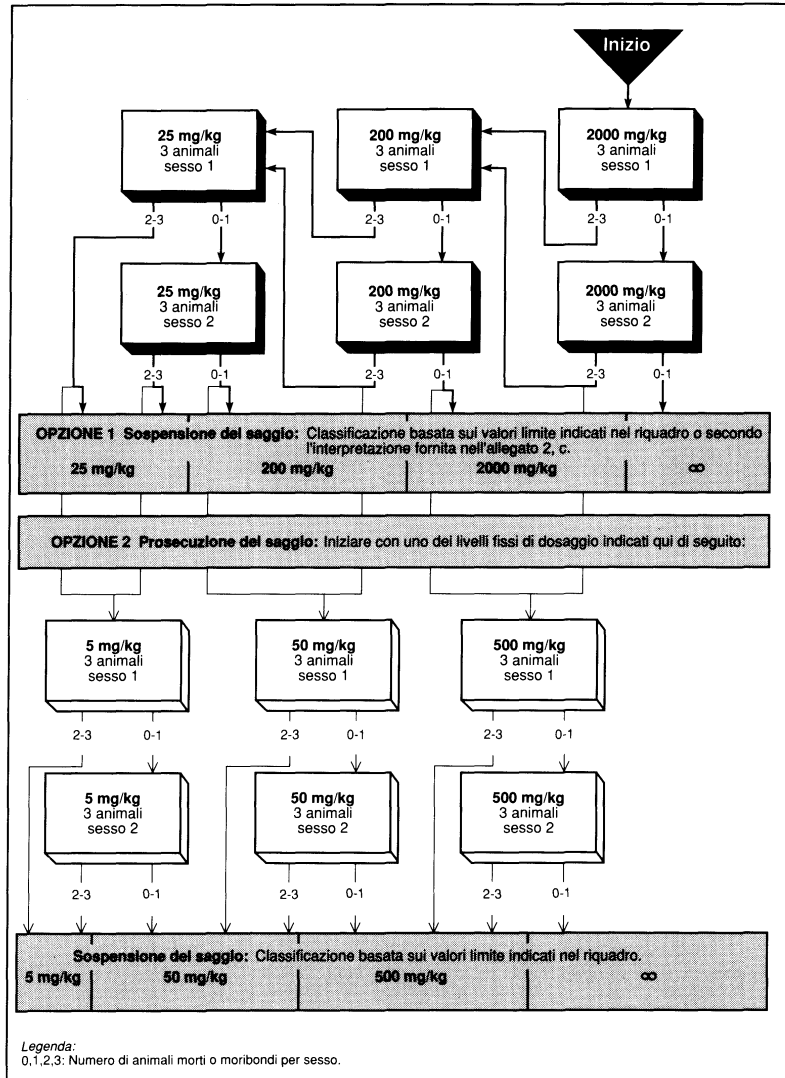
a) Schema procedurale con una dose iniziale di 25 mg/kg di peso corporeo



b) Schema procedurale con una dose iniziale di 200 mg/kg di peso corporeo



c) Schema procedurale con una dose iniziale di 2000 mg/kg di peso corporeo



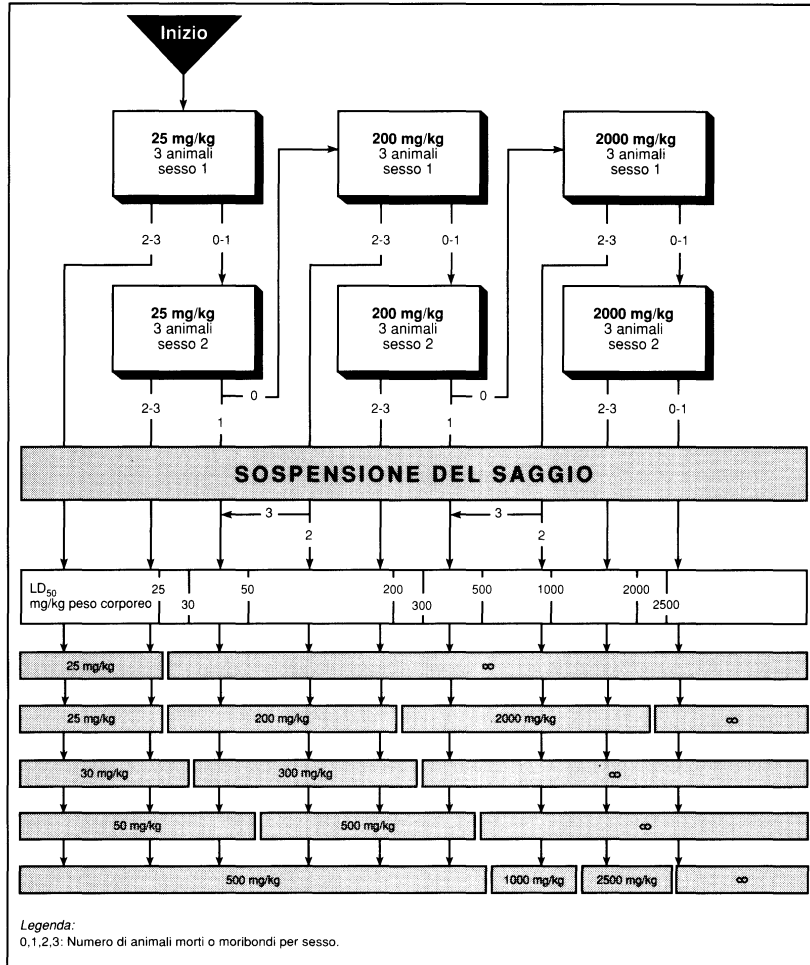
ALLEGATO 2

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI IN BASE AL PROCEDIMENTO PREVISTO DALL'OPZIONE 1

Negli schemi riportati nel presente allegato, i riquadri grigi posti sotto il riquadro «sospensione del saggio» recano i valori limite per la classificazione. Secondo lo schema procedurale previsto dall'opzione 1, si segue l'apposita freccia verso il basso fino a raggiungere il riquadro grigio appropriato.

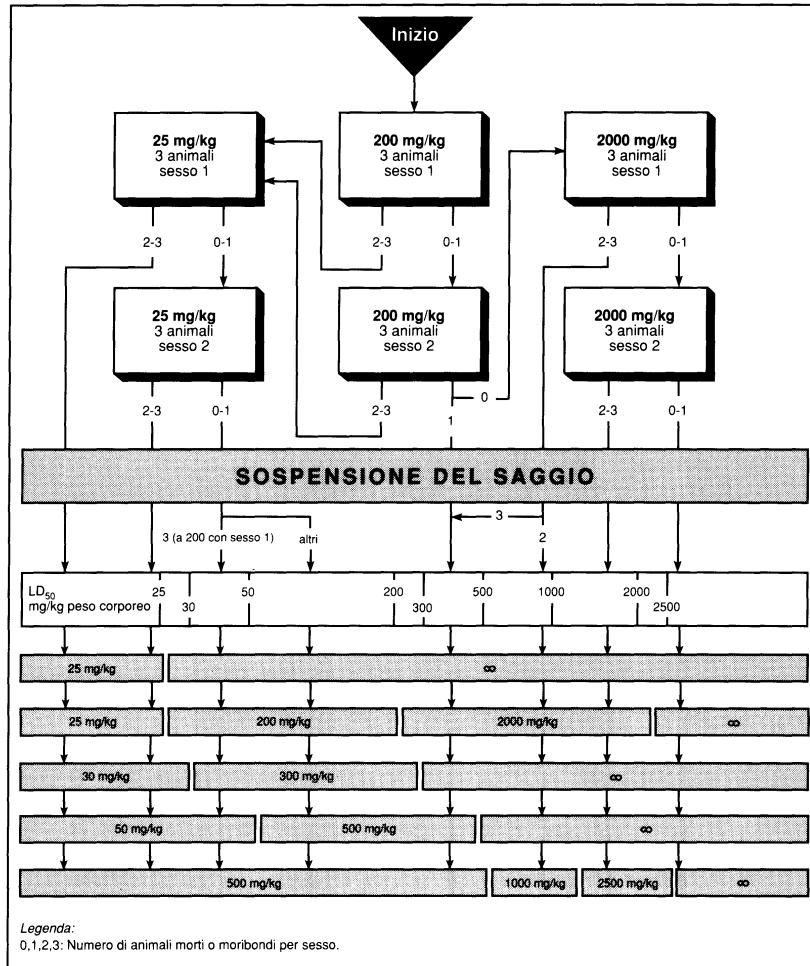
a) Interpretazione dei risultati in base al procedimento previsto dall'opzione 1

Dose iniziale: 25 mg/kg di peso corporeo



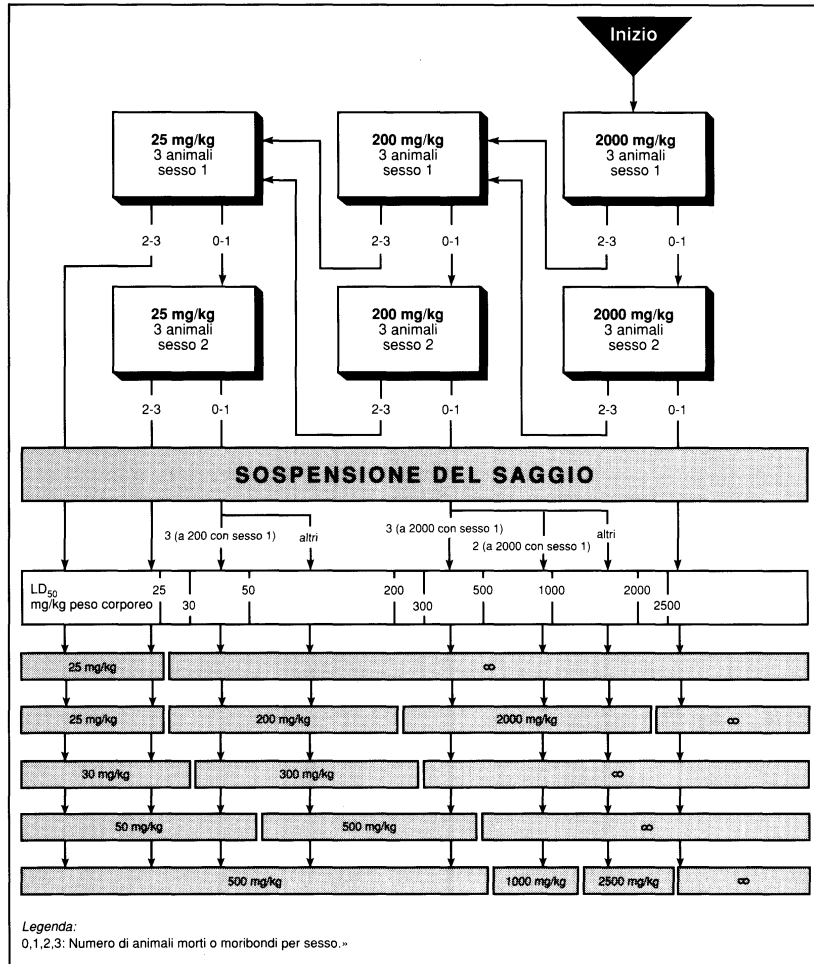
b) Interpretazione dei risultati in base al procedimento previsto dall'opzione 1

Dose iniziale: 200 mg/kg di peso corporeo



c) Interpretazione dei risultati in base al procedimento previsto dall'opzione 1

Dose iniziale: 2000 mg/kg di peso corporeo



B.2. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

È utile avere informazioni preliminari sulla distribuzione della dimensione delle particelle, la tensione di vapore, il punto di fusione, punto di ebollizione, il punto di infiammabilità e l'esplosività (se del caso) della sostanza.

Si veda anche introduzione generale, parte B (A).

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B (B).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Diversi gruppi di animali da esperimento sono esposti a concentrazioni graduate della sostanza in esame per un determinato periodo di tempo (una concentrazione per gruppo). Si procede poi all'osservazione degli effetti e degli eventi letali. Gli animali che muoiono durante l'esperimento sono sottoposti a necropsia e quelli che sopravvivono sono sottoposti a necropsia alla fine dell'esperimento.

Può essere necessario sopprimere umanamente gli animali che mostrano segni gravi e persistenti di sofferenza e di dolore. Non è necessario eseguire la somministrazione di dosi delle sostanze in esame in una maniera che può provocare dolore e sofferenza marcate a motivo di proprietà corrosive o gravemente irritanti.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.6.1. Preparazioni

Prima del saggio gli animali sono tenuti nelle condizioni di stabulazione e di alimentazione dell'esperimento per un periodo di almeno 5 giorni. Prima del saggio gli animali, che dovranno essere giovani adulti e sani sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi necessari per il saggio. Non è necessario sottoporre gli animali a una esposizione simulata, a meno che ciò non sia richiesto dal tipo di dispositivo utilizzato per l'esposizione.

Le sostanze di prova solide possono richiedere una micronizzazione allo scopo di ottenere particelle di dimensione appropriata. Ove necessario, alla sostanza in esame uò essere aggiunto un veicolo idoneo per facilitare una concentrazione appropriata della sostanza in esame nell'atmosfera e, in tal caso, deve essere utilizzato un gruppo di controllo per il veicolo. Se per facilitare il dosaggio si impiega un veicolo o altri additivi, questi non dovrebbero produrre effetti tossici. Se appropriato, possono essere utilizzati dati storici.

1.6.2. Condizioni per il saggio

1.6.2.1. Animali da esperimento

Salvo controindicazioni, il ratto è la specie d'elezione. Si dovrebbero utilizzare ceppi di laboratorio comunemente usati. Per ciascun sesso, all'inizio del saggio la variazione ponderale degli animali utilizzati non dovrebbe superare del $\pm 20\%$ il valore medio.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ogni livello di concentrazione vengono utilizzati almeno dieci roditori (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile). Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide.

Nota: nei saggi di tossicità acuta con animali di ordine superiore ai roditori, si dovrebbe prendere in considerazione l'uso di un numero minore di animali.

Le dosi devono essere accuratamente scelte e si deve fare ogni sforzo possibile per non superare dosi moderatamente tossiche. In tali prove si dovrebbe evitare la somministrazione di dosi letali della sostanza in esame.

1.6.2.3. Concentrazioni di esposizione

Queste dovranno essere in numero sufficiente, almeno tre, e opportunamente intervallate, onde produrre nei gruppi trattati una graduazione di effetti tossici e di mortalità. I risultati dovrebbero essere sufficienti per fornire una curva mortalità-concentrazione e, quando possibile, permettere un'accettabile determinazione della CL50.

1.6.2.4 Saggio limite

Se un'esposizione di 5 animali maschi e di 5 animali femmine da esperimento per 4 ore a 20 mg/l di un gas o 5 mg/l di un aerosol o di una sostanza particellata (o, se ciò non è possibile, a causa di proprietà fisiche o chimiche, comprese quelle esplosive della sostanza in esame, alla concentrazione massima raggiungibile) non provoca entro 14 giorni mortalità legata al composto in esame, si può considerare che non sono necessarie ulteriori prove.

1.6.2.5. Tempo di esposizione

Il periodo di esposizione dovrà essere di 4 ore.

1.6.2.6. Attrezzatura

Gli animali dovranno essere sottoposti all'esperimento con dispositivi per l'inalazione appositamente progettati per consentire un flusso d'aria dinamico di almeno 12 ricambi d'aria all'ora, per assicurare un adeguato contenuto di ossigeno e un'atmosfera di esposizione distribuita uniformemente. Qualora sia usata una camera, essa dovrà essere progettata in modo da evitare l'affollamento degli animali da esperimento e al tempo stesso rendere massima l'esposizione alla sostanza in esame mediante inalazione. Come regola generale, onde garantire la stabilità dell'atmosfera nella camera, il «volume» complessivo degli animali del saggio non dovrebbe superare il 5 % di quello della camera di saggio. Si può ricorrere ad una esposizione oro-nasale, della sola testa o di tutto il corpo in camera singola; le prime due modalità di esposizione aiuteranno a rendere minimo l'assorbimento delle sostanze attraverso altre vie.

1.6.2.7. Periodo di osservazione

Il periodo di osservazione dovrebbe essere di almeno 14 giorni. Tuttavia la durata dell'osservazione non dovrebbe essere fissata rigidamente. Essa dovrebbe essere determinata dalla natura delle reazioni tossiche, dalla velocità del loro insorgere e dalla durata del periodo di recupero; essa può, quindi, essere estesa se considerato necessario. Il momento in cui si manifestano e scompaiono i sintomi di tossicità e quello nel quale interviene il decesso, sono importanti, soprattutto quando la sostanza tenda a causare mortalità ritardata.

1.6.3. Procedimento

Gli animali sono pesati poco prima dell'esposizione e quindi esposti alla concentrazione di saggio nell'apposito dispositivo, per un periodo di 4 ore, dopo aver effettuato l'equilibramento della concentrazione nella camera di inalazione. Il tempo di equilibramento dovrebbe essere breve. Il saggio dovrebbe essere effettuato ad una temperatura di $22\text{ C} \pm 3\text{ C}$. Da un punto di vista ottimale l'umidità relativa dovrebbe essere mantenuta tra il 30 e il 70 % ma, in taluni casi

(ad esempio, prove di aerosol), ciò può non essere realizzabile. Mantenendo una pressione leggermente negativa all'interno della camera (7-5 mm di acqua) si impedirà un trafilamento della sostanza in esame nell'area circostante. Durante l'esposizione, la somministrazione di cibo e acqua deve essere sospesa. Si devono usare sistemi adatti per la generazione e il controllo dell'atmosfera d'esame. Il sistema dovrà assicurare che condizioni di esposizione stabili vengano realizzate il più rapidamente possibile. La camera deve essere progettata e fatta funzionare in modo da mantenere una distribuzione omogenea dell'atmosfera sperimentale all'interno della camera. Si dovranno misurare o controllare:

(a) la velocità del flusso d'aria (in continuo).

(b) la concentrazione effettiva della sostanza in esame misurata nella zona di respirazione almeno tre volte durante l'esposizione (alcune atmosfere, per esempio aerosoli ad alta concentrazione, possono richiedere un controllo più frequente). Durante il periodo di esposizione, la concentrazione non dovrebbe variare più del $\pm 15\%$ del valore medio. Tuttavia nel caso di alcuni aerosol questo livello di regolazione può non essere realizzabile, e in tal caso è accettabile un intervallo più ampio. Per gli aerosol, si deve eseguire con la frequenza necessaria (almeno una volta per gruppo di prova) l'analisi della dimensione delle particelle.

(c) temperatura e umidità, in continuo se possibile.

Durante e dopo l'esposizione, si procede all'effettuazione e alla registrazione sistematica delle osservazioni effettuate; registrazioni individuali dovranno essere tenute per ciascun animale.

Durante il primo giorno le osservazioni dovrebbero essere frequenti. Un attento esame clinico dovrà essere effettuato almeno una volta al giorno per cinque giorni per settimana. Altre osservazioni dovranno essere effettuate quotidianamente con azioni appropriate per minimizzare la perdita di animali da studiare, ad esempio necropsia e refrigerazione degli animali trovati morti e isolamento o sacrificio degli animali deboli e moribondi. Le osservazioni dovrebbero comprendere le alterazioni della cute e del pelo, degli occhi, delle membrane mucose e del sistema respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento dell'animale. Particolare attenzione dovrebbe essere rivolta all'osservazione del comportamento respiratorio, di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Il momento in cui sopraggiunge il decesso dell'animale dovrà essere registrato con la massima precisione possibile. I valori ponderali degli animali dovranno essere determinati settimanalmente dopo l'esposizione e al momento del decesso. Gli animali che muoiono durante il saggio e quelli che sopravvivono a conclusione dello stesso sono sottoposti a necropsia con particolare riferimento alle alterazioni del tratto respiratorio superiore e inferiore. Si dovranno registrare tutti i cambiamenti patologici macroscopici. Ove del caso, i tessuti dovrebbero essere prelevati per l'esame istopatologico.

2. DATI

I dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio del saggio, il momento del decesso di ciascun animale, il numero di animali che presentano altri sintomi di tossicità, la descrizione degli effetti tossici e i risultati della necropsia. Le variazioni ponderali devono essere calcolate e registrate quando la sopravvivenza sia superiore ad un giorno. Gli animali che sono soppressi per motivi umanitari in conseguenza di sofferenze e dolore dovuti al composto sono registrati come morti dovute al composto. La CL50 dovrà essere determinata con un metodo riconosciuto. La valutazione dei dati dovrà comprendere il rapporto, se esistente, tra l'esposizione degli animali alla sostanza in esame e l'incidenza e gravità di tutte le alterazioni incluse quelle comportamentali e cliniche, le lesioni macroscopiche, le variazioni del peso corporeo, la mortalità e qualsiasi altro effetto tossico.

3. RELAZIONE

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

- specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta ecc.;
- condizioni del saggio: descrizione dell'apparecchiatura usata per l'esposizione, incluso il modello, il tipo, le dimensioni, la sorgente d'aria, il sistema per la generazione degli aerosol, il metodo di condizionamento dell'aria e il metodo di alloggiamento degli animali nella camera di prova quando questa venga usata. Si dovrà descrivere anche l'apparecchiatura per la misura della temperatura, dell'umidità e della concentrazione di aerosol e della distribuzione delle dimensioni delle particelle di aerosol.

Dati sull'esposizione:

Questi dati dovranno essere raccolti in tabelle e presentati con i valori medi e con una misura di variabilità (ad esempio, deviazione standard) e dovranno, se possibile, includere:

- (a) velocità del flusso d'aria attraverso l'apparecchiatura di inalazione,
 - (b) temperatura e umidità dell'aria,
 - (c) concentrazioni nominali (quantitativo totale della sostanza in esame introdotta nel dispositivo per l'inalazione diviso per il volume d'aria);
 - (d) natura dell'eventuale veicolo, se usato;
 - (e) concentrazioni effettive nella zona di respirazione;
 - (f) il diametro aerodinamico mediano in massa (DAMM) e la deviazione standard geometrica (DSG);
 - (g) periodo di equilibratura;
 - (h) periodo di esposizione;
- tabulazione dei dati di risposta per sesso e per livello di esposizione (cioè il numero di animali morti o sacrificati durante la prova; il numero di animali che presentano sintomi di tossicità; numero di animali esposti);
 - momento della morte durante o dopo l'esposizione, ragioni e criteri usati per la eutanasia di animali;
 - tutte le osservazioni;
 - CL50 per ciascun sesso determinata alla fine del periodo di osservazione (specificando il metodo di calcolo);
 - intervallo di confidenza statistica del 95 % per la CL50 (quando questo possa venire fornito);
 - curve dose-mortalità e relativo coefficiente angolare (se il metodo di determinazione lo permette);
 - risultati dell'esame necroscopico;
 - qualsiasi risultato istopatologico;
 - discussione dei risultati (particolare attenzione deve essere dedicata all'effetto che la eutanasia di animali durante la prova può avere sul valore calcolato della CL50);
 - interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto E).

B.3. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA CUTANEA

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame viene applicata a livelli di dose graduati, un livello di dose per gruppo, sulla cute di vari gruppi di animali di saggio. Si procede poi all'osservazione degli effetti e degli eventi letali. Gli animali morti o sacrificati durante il saggio sono sottoposti a necropsia e i sopravvissuti lo sono a conclusione del saggio. Può essere necessario sottoporre a eutanasia gli animali che mostrano segni gravi e persistenti di sofferenza e di dolore; non bisogna eseguire la somministrazione di dosi delle sostanze in esame in una maniera che notoriamente provoca dolore e sofferenza marcate a motivo delle proprietà corrosive o gravemente irritanti.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO ADOTTATO PER IL SAGGIO

1.6.1. Preparazioni

Per almeno cinque giorni prima dell'esperimento, gli animali sono tenuti nelle gabbie usate per il saggio nelle stesse condizioni di stabulazione e di alimentazione dell'esperimento. Prima del saggio, gli animali che dovranno essere giovani adulti e sani, sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi sperimentali. Circa 24 ore prima del saggio, si effettua il taglio o la rasatura del pelo nella parte dorsale del corpo della cavia. Durante le operazioni di taglio o rasatura, si deve badare a non ledere la cute dell'animale per evitarne l'abrasione che potrebbe alterarne la permeabilità. Si dovrà preparare almeno il 10 % della superficie corporea per l'applicazione della sostanza in esame. Le sostanze solide, che potranno essere eventualmente ridotte in polvere, dovrebbero essere inumidite con acqua o, se necessario, con un veicolo adatto ad assicurare un buon contatto con la cute. Se viene utilizzato un veicolo, si dovrà tener conto dell'influenza dello stesso sulla penetrazione cutanea della sostanza in esame. Le sostanze liquide generalmente vengono saggiate senza diluizione.

1.6.2. Condizioni del saggio

1.6.2.1. Animali da esperimento

PER LA CONTINUAZIONE DEL TESTO VEDI SOTTO NUMERO: 392L0069.3

Possono essere utilizzati ratti o conigli adulti. Si possono utilizzare altre specie animali, ma il loro uso dovrebbe essere giustificato. Dovrebbero essere utilizzati ceppi di laboratorio comunemente usati. Per ciascun sesso, all'inizio della prova l'intervallo di variazione del peso degli animali utilizzati non dovrebbe essere superiore a ± 20 % del valore medio.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ciascun saggio vengono usati almeno 5 animali a ciascun livello di dosaggio. Essi dovrebbero essere tutti dello stesso sesso. Se si usano femmine, dovrebbero esse nullipare e non gravide. Nel caso siano disponibili informazioni che dimostrano che un sesso è nettamente più sensibile, si dovrebbero usare animali di questo sesso. Nota: nei saggi di tossicità acuta con animali di ordine superiore ai roditori, si dovrà prendere in considerazione l'uso di un numero minore di animali. Le dosi devono essere accuratamente scelte e si deve fare ogni sforzo possibile per non sperare dosi moderatamente tossiche. In tali prove si dovrebbe evitare la somministrazione di dosi letali della sostanza in esame.

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

Questi dovranno essere in numero sufficiente, almeno 3, e adeguatamente intervallati per produrre uno spettro di effetti tossici e di tassi di mortalità. Nel decidere i dosaggi occorre tener presente qualsiasi effetto irritante o corrosivo. I dati dovrebbero essere sufficienti per ottenere una curva dose-risposta e, quando possibile, permettere una determinazione accettabile della DL50.

1.6.2.4. Saggio limite

Si può eseguire un saggio limite ad un livello di dosaggio di almeno 2 000 mg/kg peso corporeo su un gruppo di 5 animali maschi e 5 femmine usando le procedure sopra descritte. Se si produce una mortalità dovuta al composto, può essere necessario considerare uno studio completo.

1.6.2.5. Periodo di osservazione

Il periodo di osservazione dovrebbe essere almeno di 14 giorni. Tuttavia tale durata non è tassativa. Essa dovrebbe dipendere dalla natura delle reazioni tossiche, dalla velocità della loro insorgenza e dalla lunghezza del periodo di guarigione; se necessario, quindi, essa potrà essere prolungata. Il momento in cui compaiono e spariscono i sintomi di tossicità, la loro durata e il momento in cui interviene il decesso, sono importanti soprattutto nel caso in cui la sostanza tenda a causare mortalità ritardata.

1.6.3. Procedimento

Ogni gabbia deve contenere un solo animale. La sostanza in esame dovrà essere applicata uniformemente su una superficie pari a circa il 10 % della superficie corporea totale. Per le sostanze altamente tossiche, la superficie può essere inferiore, ma dovrà essere ricoperta da uno strato per quanto possibile sottile e uniforme.

Durante il periodo di esposizione di 24 ore, le sostanze in esame dovranno essere tenute a contatto diretto della cute mediante una garza porosa e un cerotto non irritante. La parte su cui viene applicata la sostanza dovrebbe essere ulteriormente coperta in modo opportuno per tenere ferma la garza e la sostanza in esame e assicurare che gli animali non ingeriscano la sostanza stessa. Dispositivi per la limitazione dei movimenti possono essere usati per impedire agli animali di ingerire la sostanza in esame, ma l'immobilizzazione completa non è consigliabile.

Alla fine del periodo di esposizione si dovrà rimuovere la sostanza residua utilizzando acqua, se possibile, o altri prodotti idonei per la pulizia della pelle. Le osservazioni dovranno essere registrate sistematicamente non appena fatte, badando a tenere separati i dati per ciascun animale. Durante il primo giorno le osservazioni dovranno essere frequenti. Un attento esame clinico dovrà essere effettuato almeno una volta al giorno per 5 giorni per settimana. Le altre osservazioni dovrebbero essere effettuate quotidianamente, agendo appropriatamente per minimizzare la perdita di animali da studiare, ad esempio necropsia o refrigerazione degli animali trovati morti e isolamento o sacrificio degli animali deboli o moribondi.

Le osservazioni dovrebbero tener conto delle alterazioni riscontrate nel pelo, nella cute trattata, negli occhi e nelle membrane mucose e anche nel sistema respiratorio, circolatorio, nel sistema nervoso autonomo e centrale, nell'attività somatomotoria e nel comportamento dell'animale.

Particolare attenzione dovrebbe essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Il momento in cui sopraggiunge il decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile. Gli animali che muoiono durante il saggio e quelli che sopravvivono alla fine del saggio sono sottoposti a necropsia. Tutte le variazioni patologiche macroscopiche dovranno essere registrate. Ove del caso, dovrebbero essere prelevati tessuti per l'esame istopatologico.

Valutazione della tossicità nell'altro sesso

Dopo il completamento dello studio su un sesso, si somministra almeno un intervallo di dose ad un gruppo di 5 animali dell'altro sesso per controllare che gli animali di questo sesso non siano nettamente più sensibili alla sostanza in esame. In circostanze particolari può essere giustificato l'uso di un minor numero di animali. Nel caso in cui siano disponibili informazioni adeguate che dimostrano che gli animali del sesso controllato sono nettamente più sensibili, si può fare a meno di effettuare la prova su animali dell'altro sesso.

2. DATI

I risultati dovranno essere riassunti in forma tabellare indicante per ogni singolo gruppo di saggio il numero di animali presenti all'inizio del saggio, il momento del decesso di ciascun animale, il numero di animali che presentano altri segni di tossicità, la descrizione degli effetti tossici e i risultati della necropsia. Il peso di ciascun animale dovrà essere determinato e registrato poco prima dell'applicazione della sostanza, poi settimanalmente e al momento del decesso; le variazioni ponderali dovranno essere calcolate e registrate quando la sopravvivenza sia superiore a un giorno. Gli animali che vengono sottoposti ad eutanasia in conseguenza di sofferenza e dolore dovuti al composto vengono registrati come morti in conseguenza del composto. La DL50 può essere determinata con un metodo riconosciuto. La valutazione dei dati dovrebbe includere il rapporto, se esistente, tra l'esposizione degli animali alla sostanza in esame e l'incidenza e gravità di tutte le alterazioni, incluse quelle comportamentali e cliniche, le lesioni macroscopiche, le variazioni del peso corporeo, la mortalità e qualsiasi altro effetto tossico.

3. RELAZIONE

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

- specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta, ecc.;
- condizioni sperimentali (inclusa la tecnica di pulizia della cute e il tipo di medicazione; occlusiva o non occlusiva);
- livelli di dosaggio (col veicolo, se usato, e concentrazione);
- sesso degli animali sottoposti a somministrazione;
- tabulato dei dati di risposta per dose e livello di dosaggio (cioè il numero di animali morti o sacrificati durante la prova; numero di animali che presentano sintomi di tossicità; numero di animali esposti);
- tempo intercorso tra la somministrazione della sostanza e la morte, ragioni e criteri usati per la eutanasia di animali;
- tutte le osservazioni;
- valore della DL50 per il sesso sottoposto ad uno studio completo, determinato dopo 14 giorni, specificando il metodo di determinazione;
- intervallo di confidenza statistica del 95 % per la DL50 (se può essere fornito);
- curva dose-mortalità e relativo coefficiente angolare (se il metodo di determinazione lo consente);
- risultati necroscopici;
- qualsiasi altro reperto istopatologico;
- risultati di eventuali saggi sull'altro sesso;

- discussione dei risultati (occorre dedicare una particolare attenzione all'effetto che la eutanasia di animali durante la prova può avere sul valore calcolato della DL50);
- interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto E).

B. 6 SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

1. METODO

1.1. Introduzione

Note:

La sensibilità dei saggi e la loro efficacia nell'individuazione di potenziali sensibilizzatori della cute umana costituiscono parametri importanti in un sistema di classificazione della tossicità per la tutela della salute pubblica.

Non esiste un unico metodo sperimentale atto a identificare correttamente tutte le sostanze dotate di un potenziale sensibilizzante per la cute umana e quindi sistematicamente applicabile.

Nella scelta del metodo occorre tener conto di fattori quali le caratteristiche fisiche di una sostanza, compresa la sua capacità di penetrazione cutanea.

Sono stati elaborati due tipi di saggio su porcellini d'India: il saggio con utilizzo di adiuvanti, nel quale uno stato allergico viene potenziato sciogliendo o sospendendo la sostanza in esame in adiuvante completo di Freund (ACF), e il saggio senza utilizzo di adiuvante.

I saggi con utilizzo di adiuvante offrono generalmente un più elevato grado di precisione nell'individuare un potenziale di sensibilizzazione cutanea nell'uomo rispetto ai metodi che non prevedono l'uso dell'adiuvante completo di Freund. Essi sono pertanto preferibili.

Il "Guinea-Pig Maximisation Test" (GPMT) è un test con utilizzo di adiuvante ampiamente usato. Malgrado esistano diversi altri metodi per identificare il potenziale di sensibilizzazione cutanea di una sostanza, il GPMT è considerato il metodo con adiuvante d'elezione.

Per molte classi di sostanze chimiche, i saggi senza utilizzo di adiuvante (fra cui il più diffuso è quello di Buehler) sono considerati meno sensibili.

In alcuni casi il saggio di Buehler, che prevede un'applicazione topica della sostanza, può risultare preferibile all'iniezione intradermica utilizzata nel Guinea-Pig Maximisation Test. Qualora si opti per il saggio di Buehler, si dovrà fornire una giustificazione scientifica.

Il Guinea-Pig Maximisation Test (GPMT) e il saggio di Buehler sono descritti nel presente metodo. È possibile il ricorso ad altri metodi, purché siano debitamente convalidati e venga fornita una giustificazione scientifica.

In caso di risultato positivo di un saggio di screening riconosciuto, la sostanza in esame può essere considerata un potenziale sensibilizzante e non è necessario condurre un ulteriore test GPMT. Tuttavia in caso di risultato negativo del saggio di screening è necessario condurre un test GPMT attenendosi alla procedura descritta nel presente metodo di saggio.

Vedi anche introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Sensibilizzazione cutanea: (dermatite allergica da contatto) è una reazione cutanea a una sostanza mediata da fattori immunologici. Nell'uomo la reazione può essere caratterizzata da prurito, eritema, edema, papule, vescicole, bolle o da una combinazione di queste manifestazioni. In altre specie le reazioni possono differire e limitarsi alla comparsa di eritemi e di edemi.

Esposizione di induzione: esposizione sperimentale di un soggetto alla sostanza in esame al fine di indurre uno stato di ipersensibilità.

Periodo di induzione: periodo della durata minima di una settimana, successivo all'esposizione di induzione, entro il quale può manifestarsi uno stato di ipersensibilità.

Esposizione di provocazione: in un soggetto già trattato, esposizione sperimentale alla sostanza in esame, effettuata successivamente al periodo di induzione al fine di accertare se il soggetto sviluppa una reazione di ipersensibilità.

1.3. Sostanze di riferimento

La sensibilità e l'attendibilità della tecnica sperimentale utilizzata devono essere verificate ogni sei mesi utilizzando sostanze notoriamente dotate di proprietà di sensibilizzazione cutanea di grado leggero-medio.

In un saggio eseguito correttamente, per sensibilizzanti di tipo leggero-medio si dovrebbe avere una risposta pari ad almeno il 30 % con il metodo con adiuvanti e ad almeno il 15 % con il metodo senza adiuvanti.

Si farà preferibilmente ricorso alle seguenti sostanze:

Numero CAS-	Numero EINECS-	Denominazione EINECS	Denominazione corrente
101-86-0	202-983-3	α -esilcinnamaldeide	α -esilcinnamaldeide
149-30-4	205-736-8	benzothiazol-2-tiolo (mercapto-benzothiazolo)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaina	norcaina

Qualora le circostanze lo giustifichino, potranno essere utilizzate altre sostanze di controllo conformi ai criteri suelencati.

1.4. Principio del metodo di saggio

In un primo tempo gli animali vengono esposti alla sostanza da saggiare con iniezioni intradermiche e/o applicazione epidermica (esposizione di induzione). Dopo un periodo di riposo di 10-14 giorni (periodo di induzione), in cui si può sviluppare una risposta immunitaria, essi vengono esposti alla dose di provocazione. L'estensione e la gravità della reazione cutanea all'esposizione di provocazione vengono confrontate con la reazione sviluppata dagli animali di controllo trattati con un placebo nella fase di induzione e sottoposti all'esposizione di provocazione.

1.5. Descrizione dei metodi di saggio

Se lo si ritiene necessario, si procederà alla rimozione della sostanza da saggiare utilizzando acqua o un solvente appropriato, in modo da non alterare la reazione in corso, né intaccare l'integrità dell'epidermide.

1.5.1. Guinea-Pig Maximisation Test (GMPT)

1.5.1.1. Preparazioni

Porcellini d'India albini, giovani e sani, vengono acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali vengono suddivisi in modo casuale ed assegnati al gruppo da trattare o al gruppo di controllo. In funzione del metodo di saggio utilizzato, il pelo verrà tagliato, rasato o rimosso con una sostanza depilatoria, avendo cura di non danneggiare la cute. Gli animali vengono pesati all'inizio e alla fine del saggio.

1.5.1.2. Condizioni sperimentali

1.5.1.2.1. Animali da esperimento

Si utilizzano porcellini d'India albini di ceppi comunemente usati in laboratorio.

1.5.1.2.2. Numero e sesso

Si utilizzano animali di sesso maschile e/o femminile. Le femmine dovranno essere nullipare e non gravide.

Il gruppo sottoposto a trattamento deve essere composto da almeno 10 animali, il gruppo di controllo da un minimo di 5. Qualora il primo gruppo comprenda meno di 20 esemplari ed il secondo meno di 10 e non sia possibile concludere che la sostanza in esame è un sensibilizzante, si consiglia di proseguire lo studio fino a disporre di almeno 20 animali trattati e 10 di controllo.

1.5.1.2.3. Livelli di dosaggio

La concentrazione della sostanza in esame utilizzata per ogni esposizione di induzione deve essere ben tollerata a livello sistemico e corrispondere alla dose massima suscettibile di produrre un'irritazione cutanea di grado leggero-medio. La concentrazione utilizzata per l'esposizione di provocazione deve corrispondere alla dose massima che non cagioni irritazione. Se necessario, la concentrazione appropriata può essere determinata con uno studio pilota condotto su due o tre animali. A questo scopo è preferibile utilizzare animali trattati con l'adiuvante completo di Freund.

1.5.1.3. Procedimento

1.5.1.3.1. Induzione

Giorno 0 — gruppo trattato

Nella regione della spalla, debitamente depilata, si praticano tre serie di due iniezioni intradermiche da 0,1 ml ciascuna. Le due iniezioni di ciascuna serie devono essere praticate l'una a sinistra e l'altra a destra della linea mediana.

Iniezione 1: miscela 1:1 (v/v) ACF/acqua o soluzione salina fisiologica

Iniezione 2: la sostanza in esame in un veicolo adatto alla concentrazione selezionata

Iniezione 3: la sostanza in esame alla concentrazione desiderata, formulata in una miscela 1:1 (v/v) ACF/acqua o soluzione salina fisiologica.

Nell'iniezione 3, le sostanze idrosolubili vengono disciolte nella fase acquosa prima di essere miscelate con l'ACF. Le sostanze liposolubili o insolubili vengono messe in sospensione nell'ACF prima di essere combinate con la fase acquosa. La concentrazione finale della sostanza in esame deve essere uguale a quella utilizzata nell'iniezione 2.

Le iniezioni 1 e 2 vengono praticate l'una accanto all'altra e quanto più possibile in prossimità della testa, mentre la 3 è praticata verso la parte caudale della zona d'esame.

Giorno 0 — gruppo di controllo

Tre serie di due iniezioni intradermiche, ciascuna del volume di 0,1 ml, sono praticate negli stessi punti scelti per gli animali trattati.

Iniezione 1: miscela 1:1 (v/v) ACF/acqua o soluzione salina fisiologica

Iniezione 2: il veicolo non diluito

Iniezione 3: formulazione 50 % p/v del veicolo in una miscela 1:1 (v/v) ACF/acqua o soluzione salina fisiologica.

Giorno 5-7 — gruppo trattato e gruppo di controllo

Circa 24 ore prima dell'applicazione topica di induzione, se la sostanza non è un irritante cutaneo, l'area di prova, debitamente tosata e/o rasata, viene trattata con 0,5 ml di laurilsolfato di sodio al 10 % in vaselina, al fine di provocare un'irritazione locale.

Giorno 6-8 — gruppo trattato

L'area di prova viene nuovamente depilata. Una carta da filtro (2×4 cm), impregnata della sostanza in esame incorporata in un veicolo adatto, viene applicata sull'area di prova e tenuta in contatto con la cute per 48 ore mediante una medicazione oclusiva. La scelta del veicolo deve essere motivata. Le sostanze solide vengono ridotte in polvere e incorporate in un veicolo adatto. I liquidi, se del caso, possono essere applicati direttamente.

Giorno 6-8 — gruppo di controllo

L'area di prova viene nuovamente depilata. Il solo veicolo viene applicato con le stesse modalità sull'area di prova e tenuto a contatto per 48 ore mediante una medicazione oclusiva.

1.5.1.3.2. Provocazione (challenge)

Giorno 20-22 — gruppo trattato e gruppo di controllo

Si rimuove il pelo dai fianchi degli animali trattati e degli animali di controllo. Su un fianco si applica una garza o una compressa impregnata della sostanza in esame e, se opportuno, sull'altro si applica una garza o una compressa impregnata del solo veicolo. Le compresse vengono tenute a contatto con la cute per 24 ore mediante una medicazione oclusiva.

1.5.1.3.3. Osservazione e valutazione: gruppo trattato e gruppo di controllo

- circa 21 ore dopo la rimozione della compressa, la zona sottoposta a "challenge" viene pulita e tosata e/o rasata e depilata, se necessario;
- circa 3 ore più tardi (approssimativamente 48 ore dall'inizio dell'applicazione di provocazione) la reazione cutanea viene esaminata e classificata in base alla scala di valutazione riportata in appendice;
- circa 24 ore dopo detto esame si procede a una seconda osservazione (72 ore) e a una nuova classificazione delle reazioni cutanee.

È consigliabile procedere ad una lettura cieca nei due gruppi di animali.

Qualora sia necessario chiarire i risultati ottenuti nel primo "challenge", una seconda esposizione di provocazione, ove del caso con un nuovo gruppo di controllo, potrà essere effettuata a circa una settimana di distanza dalla prima. Il nuovo "challenge" potrà essere realizzato anche sul gruppo di controllo iniziale.

Tutte le reazioni cutanee e qualsiasi risultato insolito, comprese le reazioni sistemiche, derivanti dall'esposizione di induzione e di provocazione, dovranno essere osservate e classificate in base alla scala di valutazione di Magnusson/Kligman (vedi appendice). Per chiarire eventuali reazioni dubbie si potrà far ricorso ad altre tecniche, quali l'esame istopatologico o la misurazione dello spessore delle pieghe cutanee.

1.5.2. Saggio di Buebler

1.5.2.1. Preparazioni

Porcellini d'India albini, giovani e sani, vengono acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali vengono suddivisi in modo casuale ed assegnati al gruppo da trattare o al gruppo di controllo. In funzione del metodo di saggio utilizzato, il pelo verrà tagliato, rasato o rimosso con una sostanza depilatoria, avendo cura di non danneggiare la cute. Gli animali vengono pesati all'inizio e alla fine del saggio.

1.5.2.2. Condizioni sperimentali

1.5.2.2.1. Animali da esperimento

Si utilizzano porcellini d'India albini di ceppi comunemente usati in laboratorio.

1.5.2.2.2. Numero e sesso

Si utilizzano animali di sesso maschile e/o femminile. Le femmine dovranno essere nullipare e non gravide.

Il gruppo sottoposto a trattamento deve essere composto da almeno 20 animali, il gruppo di controllo da un minimo di 10.

1.5.2.2.3. Livelli di dosaggio

La concentrazione della sostanza in esame utilizzata per ogni esposizione di induzione deve corrispondere alla dose massima suscettibile di produrre un'irritazione cutanea moderata e non eccessiva. La concentrazione utilizzata per l'esposizione di provocazione deve corrispondere alla dose massima che non cagioni irritazione. Se necessario, la concentrazione appropriata può essere determinata con uno studio pilota condotto su due o tre animali.

Nel caso di sostanze idrosolubili, l'acqua o una soluzione diluita non irritante di surfactante rappresentano il veicolo più appropriato. Per le altre sostanze si preferiranno una miscela di etanolo all'80 % ed acqua per la fase di induzione e dell'acetone per la fase di provocazione.

1.5.2.3. Procedimento

1.5.2.3.1. Induzione

Giorno 0 — gruppo trattato

Gli animali vengono tosati su un fianco. La compressa utilizzata per il saggio viene impregnata della sostanza in esame incorporata in un veicolo idoneo (la scelta del veicolo deve essere motivata; se del caso, le sostanze liquide possono essere applicate non diluite). La compressa viene applicata sull'area di prova e tenuta a contatto con la pelle per sei ore mediante un cerotto occlusivo e una fasciatura adeguata.

La medicazione deve essere oclusiva. Si potrà ricorrere a un tampone d'ovatta, rotondo o quadrato e di circa 4-6 cm². Per garantire l'occlusione, è opportuno limitare la libertà di movimento degli animali con un sistema adeguato. Se si utilizza una fasciatura, possono essere necessarie esposizioni supplementari.

Giorno 0 — gruppo di controllo

Gli animali vengono tosati su un fianco. Il solo veicolo viene applicato con modalità analoghe a quelle utilizzate per il gruppo trattato. La compressa viene tenuta a contatto con la pelle per sei ore mediante un cerotto oclusivo e una fasciatura adeguata. Se si dimostra che non è necessario disporre di un gruppo di controllo cui sia stato somministrato un placebo, si potrà utilizzare un gruppo di controllo non sottoposto a tale trattamento.

Giorni 6-8 e 13-15 — gruppo trattato e gruppo di controllo

Si esegue la stessa applicazione del giorno 0 sulla medesima area di prova (rasata, se necessario) sulla stesso fianco il giorno 6-8 e nuovamente il giorno 13-15.

1.5.2.3.2. Provocazione (challenge)

Giorno 27-29 — gruppo trattato e gruppo di controllo

Il fianco non trattato degli animali trattati e degli animali di controllo viene tosato. Si procede quindi all'applicazione di un cerotto oclusivo o di una compressa contenente un'adeguata quantità della sostanza in esame, alla massima concentrazione non irritante, sulla parte posteriore del fianco non trattato in entrambi i gruppi di animali.

Se necessario, si applica inoltre un cerotto oclusivo o una compressa contenente il solo veicolo sulla parte anteriore del fianco non trattato di entrambi i gruppi di animali. Il cerotto o la compressa vengono tenuti a contatto con la pelle per 6 ore mediante un'adeguata medicazione.

1.5.2.3.3. Osservazione e valutazione

- Circa 21 ore dopo la rimozione del cerotto, la zona sottoposta a "challenge" viene depilata;
- circa tre ore più tardi (approssimativamente 30 ore dopo l'applicazione di provocazione) le reazioni cutanee vengono esaminate e classificate in base alla scala di valutazione riportata in appendice;
- circa 24 ore dopo detto esame (approssimativamente 54 ore dopo l'applicazione di provocazione) si procede a una seconda osservazione e a una nuova classificazione delle reazioni cutanee.

È consigliabile procedere ad una lettura cieca nei due gruppi di animali.

Qualora sia necessario chiarire ulteriormente i risultati ottenuti nel primo "challenge", una seconda esposizione di provocazione, ove del caso con un nuovo gruppo di controllo, potrà essere effettuata a circa una settimana di distanza dalla prima. Il nuovo "challenge" potrà essere realizzato anche sul gruppo di controllo iniziale.

Tutte le reazioni cutanee e qualsiasi risultato insolito, comprese le reazioni sistemiche, derivanti dall'esposizione di induzione e di provocazione, dovranno essere osservate e classificate in base alla scala di valutazione di Magnusson/Kligman (vedi appendice). Per chiarire eventuali reazioni dubbie si potrà far ricorso ad altre tecniche, quali l'esame istopatologico o la misurazione dello spessore delle pieghe cutanee.

2. DATI (GPMT E SAGGIO DI BUEHLER)

I dati saranno riassunti in forma tabulare, indicando, per ogni animale, le reazioni cutanee rilevate nel corso di ogni osservazione.

3. **RELAZIONE (GPMT E SAGGIO DI BUEHLER)**

Se il saggio sul porcellino d'India è preceduto da una prova preliminare, si avrà cura di fornirne la descrizione o il riferimento (p. es. Local Lymph Node Assay (LLNA), Mouse Ear Swelling Test (MEST), compreso il procedimento particolareggiato, insieme ai risultati ottenuti con le sostanze da saggiare e le sostanze di riferimento.

Relazione sul saggio (GPMT E SAGGIO DI BUEHLER)

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

Animali da esperimento

- ceppo di porcellino d'India utilizzato;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di alloggiamento, dieta, ecc.;
- peso di ogni singola cavia all'inizio dell'esperimento.

Condizioni sperimentali:

- tecnica di preparazione dell'area di applicazione della compressa;
- materiali utilizzati e tecnica di preparazione e di applicazione della compressa;
- risultato dello studio pilota e conclusioni relative alle concentrazioni di induzione e di provocazione da utilizzare nel saggio;
- modalità di preparazione, applicazione e rimozione della sostanza in esame;
- motivazione della scelta del veicolo;
- concentrazioni del veicolo e della sostanza utilizzate per le esposizioni di induzione e di provocazione, nonché quantità totale di sostanza applicata per l'induzione e la provocazione.

Risultati:

- un riepilogo dei risultati dell'ultimo controllo di sensibilità e attendibilità (vedi 1.3), comprese le informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo utilizzato;
- tutte le osservazioni effettuate su ogni singolo animale, compreso il sistema di classificazione;
- la descrizione della natura e dell'entità degli effetti osservati;
- tutti i reperti dell'esame istopatologico.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI**

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 406.

Appendice

TABELLA:

scala di Magnusson/Kligman per la classificazione delle reazioni al saggio di provocazione cutanea

- 0 = assenza di modificazioni visibili
 - 1 = eritema localizzato o a distribuzione irregolare
 - 2 = eritema modesto e confluyente
 - 3 = eritema intenso associato a tumefazione
-

B.7 TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA ORALE METODO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Principio del metodo di saggio

La sostanza in esame viene somministrata in dosi giornaliere graduate ad alcuni gruppi di animali da esperimento, un livello di dose per gruppo, per un periodo di 28 giorni. Durante il periodo di somministrazione gli animali vengono giornalmente esaminati al fine di rilevare eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti o soppressi durante l'esperimento vengono sottoposti a necropsia. Al termine del saggio gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a necropsia.

Il presente metodo attribuisce particolare importanza agli effetti neurologici in quanto parametro specifico di valutazione e comporta la necessità di un'accurata osservazione clinica degli animali per ottenere il maggior numero possibile di informazioni. Tale metodo è finalizzato all'individuazione di sostanze chimiche dotate di un potenziale neurotossico, che potranno successivamente richiedere indagini più approfondite al riguardo. Esso può inoltre fornire indicazioni sugli effetti immunologici e sulla tossicità per l'apparato riproduttivo.

1.4. Descrizione del metodo di saggio

1.4.1. Preparazioni

Animali adulti, giovani e sani, vengono suddivisi in modo casuale e assegnati a gruppi da trattare e a gruppi di controllo. Le gabbie dovranno essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali vengono identificati individualmente e tenuti nelle loro gabbie per un periodo di almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio, in modo da potersi acclimatare alle condizioni di laboratorio.

La sostanza in esame viene somministrata a mezzo di sonda gastrica, con gli alimenti e con l'acqua. La modalità di somministrazione orale viene scelta in funzione della finalità dello studio e delle proprietà fisico-chimiche della sostanza.

Se necessario, la sostanza in esame viene disciolta o messa in sospensione in un veicolo adeguato. Ove possibile, si preferirà una soluzione/sospensione acquosa, o, come seconda alternativa, una soluzione/emulsione in olio (per esempio olio di mais), o ancora, infine, una soluzione in altri veicoli. Per i veicoli non acquosi, dovranno esserne note le caratteristiche di tossicità. È opportuno determinare la stabilità della sostanza in esame nel veicolo.

1.4.2. Condizioni sperimentali

1.4.2.1. Animali da esperimento

Il ratto è la specie d'elezione, ma sono ammesse anche altre specie di roditori. Si utilizzeranno animali adulti, giovani e sani, di ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine dovranno essere nullipare e non gravide. La somministrazione dovrà prima possibile al termine dello svezzamento, e comunque non oltre la nona settimana di vita.

All'inizio dello studio, la variazione di peso degli animali dovrà essere minima e non essere superiore al ± 20 per cento del peso medio per ogni sesso.

Qualora, prima di uno studio a lungo termine, si effettui uno studio preliminare con somministrazione orale ripetuta, si utilizzeranno di preferenza in entrambi animali provenienti dallo stesso ceppo e aventi la medesima origine.

1.4.2.2. Numero e sesso

Per ciascun livello di dosaggio dovranno essere utilizzati almeno 10 animali (cinque femmine e 5 maschi). Se il protocollo sperimentale prevede la soppressione di animali nel corso dello studio, il numero totale dovrà essere aumentato in ragione del numero di animali che si prevede di sacrificare.

Inoltre, un gruppo satellite di 10 animali (cinque per sesso) potrà essere trattato alla dose massima per 28 giorni e tenuto in osservazione nei 14 giorni successivi al fine di valutare la reversibilità, la persistenza o la comparsa tardiva di effetti tossici. È altresì previsto l'utilizzo di un gruppo satellite di 10 animali di controllo (cinque animali per sesso).

1.4.2.3. Livelli di dosaggio

Si utilizzano generalmente almeno tre gruppi da trattare e un gruppo di controllo. Quest'ultimo, fatta eccezione per la somministrazione della sostanza in esame, dovrà essere trattato in modo identico ai gruppi sottoposti a trattamento. Qualora la sostanza da saggiare venga incorporata in un veicolo, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo veicolo nel volume massimo utilizzato.

Se, in base alla valutazione di altri dati, sussistono motivi per ritenere che un dosaggio di 1 000 mg/kg pc/d non dovrebbe produrre effetti, è possibile eseguire un saggio limite. In mancanza di dati al riguardo, potrà essere effettuato uno studio finalizzato alla determinazione di un range entro il quale selezionare le dosi da somministrare.

I livelli di dosaggio dovranno essere selezionati tenendo conto di tutti i dati esistenti sulla tossicità e le caratteristiche (tossico-)cinetiche della sostanza da saggiare o di sostanze affini. Il livello massimo di dosaggio dovrà essere tale da indurre effetti tossici senza tuttavia cagionare la morte o sofferenze gravi. Sarà inoltre definita una serie decrescente di dosaggi al fine di individuare eventuali risposte a dosi determinate e dimostrare l'assenza di effetti avversi al dosaggio minimo (NOAEL, no-observed-adverse effects). Per la determinazione dei livelli decrescenti di dosaggio risulta spesso ottimale applicare un fattore di divisione compreso tra due e quattro; è comunque preferibile aggiungere un quarto gruppo di studio piuttosto che avere uno scarto eccessivo (superiore ad un fattore 10) tra una dose e l'altra.

Se la sostanza è somministrata con gli alimenti o con l'acqua, è importante verificare che le quantità di sostanza necessarie non alterino il bilancio idrico o nutrizionale. Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare sia una concentrazione dietetica (ppm), sia un livello di dosaggio costante in funzione del peso degli animali, avendo cura di specificare quale sia l'alternativa prescelta. Se la sostanza è somministrata tramite sonda gastrica, la dose deve essere somministrata ogni giorno alla stessa ora e modificata in modo da mantenere un dosaggio costante in funzione del peso dell'animale.

Qualora, prima di uno studio a lungo termine, si effettui uno studio preliminare con somministrazione orale ripetuta, la dieta degli animali dovrà essere identica in entrambi.

1.4.2.4. Saggio limite

Qualora un saggio, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o, in caso di somministrazione con gli alimenti o l'acqua, ad una concentrazione equivalente (in funzione del peso corporeo), non produca effetti tossici evidenti e se i dati relativi a sostanze di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario eseguire uno studio completo utilizzando tre dosaggi. Il saggio limite è giustificato, salvo nel caso in cui l'esposizione umana comporti la necessità di utilizzare un più elevato livello di dosaggio.

1.4.2.5. Periodo di osservazione

Il periodo di osservazione ha una durata di 28 giorni. Gli animali del gruppo satellite selezionati per effettuare ulteriori osservazioni dovranno essere esaminati per almeno altri 14 giorni senza alcun trattamento al fine di individuare l'insorgenza, la persistenza o la scomparsa tardiva degli effetti tossici.

1.4.3. Procedimento

La sostanza in esame viene somministrata agli animali giornalmente, sette giorni su sette, per un periodo di 28 giorni. La scelta di somministrare la sostanza cinque giorni alla settimana deve essere opportunamente motivata. Se effettuata mediante intubazione, la somministrazione avverrà in una singola dose mediante sonda gastrica o apposita cannula. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Esso non dovrebbe

superare 1 ml/100 g di peso corporeo, eccetto nel caso di soluzioni acquose, dove sono ammessi 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze irritanti o corrosive, suscettibili di produrre effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, la variabilità del volume di saggio dovrà essere ridotta al minimo ritoccano la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per qualsiasi livello di dosaggio.

1.4.3.1. Osservazioni generali

Osservazioni cliniche generali devono essere effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa ora e tenendo conto del periodo probabile di massima intensità degli effetti dopo la somministrazione. Si registreranno informazioni concernenti le condizioni di salute degli animali. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità. Gli animali moribondi o recanti segni di grave sofferenza o dolore saranno immediatamente esclusi dallo studio, sottoposti ad eutanasia e a necropsia. Prima dell'esposizione iniziale (per consentire un confronto sullo stesso soggetto) e almeno una volta alla settimana successivamente tutti gli animali vengono sottoposti ad osservazioni cliniche particolareggiate. A tale scopo gli animali vengono tolti dalle gabbie, collocati in un recinto standard ed esaminati di preferenza sempre alla stessa ora. Le osservazioni vengono accuratamente registrate, possibilmente utilizzando sistemi di punteggio esplicitamente definiti dal laboratorio che esegue il saggio. Si avrà cura di ridurre al minimo le variazioni delle condizioni sperimentali e le osservazioni saranno condotte di preferenza da persone che non siano al corrente del trattamento. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle membrane mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività del sistema nervoso autonomo (p. es. 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, stereotipi (p. es. tolettatura eccessiva, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (p. es. automutilazione, marcia a ritroso).

Nella quarta settimana di esposizione si procede alla valutazione della reattività sensoriale a diversi tipi di stimolo (p. es. uditivi, visivi e propriocettivi), della forza di prensione e dell'attività motoria. Ulteriori dettagli sui metodi utilizzabili sono riportati in letteratura (vedi introduzione generale, parte B).

Le osservazioni funzionali previste per la quarta settimana di esposizione possono essere evitate nel caso di uno studio preliminare ad un successivo studio subcronico (90 giorni). In questa eventualità, le osservazioni funzionali saranno incluse nello studio complementare. D'altro canto, le informazioni ricavate possono essere utili nella determinazione dei livelli di dosaggio per un successivo studio subcronico.

In via eccezionale, le osservazioni funzionali potranno essere evitate anche per i gruppi che presentino segni di tossicità suscettibili di interferire in modo significativo con i risultati delle prove funzionali.

1.4.3.2. Peso corporeo e consumo di cibo e di acqua

Tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana. Il consumo di cibo e di acqua viene determinato con scadenza almeno settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua, anche il consumo di acqua deve essere misurato almeno una volta alla settimana.

1.4.3.3. Ematologia

Al termine del periodo di prova si effettueranno i seguenti controlli ematologici: ematocrito, concentrazione dell'emoglobina, conteggio degli eritrociti, conteggio dei leucociti totali e formula leucocitaria, conteggio delle piastrine e determinazione del tempo/potenziale di coagulazione.

I campioni di sangue devono essere prelevati in un sito determinato immediatamente prima o durante la soppressione degli animali e conservati in condizioni adeguate.

1.4.3.4. Biochimica clinica

Esami biochimico-clinici finalizzati allo studio dei principali effetti tossici sui tessuti ed in particolare sui reni e sul fegato dovranno essere effettuati sui campioni di sangue prelevati da tutti gli animali immediatamente prima o durante la loro soppressione (eccetto gli animali trovati moribondi e/o soppressi nel corso del saggio). È preferibile che gli animali vengano tenuti a digiuno dalla sera precedente il prelievo di sangue (1). Le analisi sul plasma o sul siero comprenderanno il sodio, il potassio, il glucosio, il colesterolo totale, l'urea, la creatinina, le proteine totali e l'albumina, almeno due enzimi indicatori degli effetti epatocellulari (come l'alanina aminotransferasi, l'aspartato aminotransferasi, la fosfatasi alcalina, la gamma-glutamyl transpeptidasi e la sorbitol deidrogenasi). Determinazioni di altri enzimi (di origine epatica o altro) e degli acidi biliari possono talvolta fornire indicazioni utili.

(1) Per un certo numero di analisi nel siero e nel plasma, ed in particolare per la determinazione del glucosio, è preferibile che gli animali siano a digiuno dalla sera precedente. In caso contrario, infatti, si ha una maggiore variabilità nei risultati, cosa che può dissimulare gli effetti meno evidenti e ostacolare l'interpretazione. D'altro canto, però, il digiuno può modificare il metabolismo generale degli animali e, soprattutto negli studi sull'alimentazione, perturbare l'esposizione giornaliera alla sostanza in esame. Se si opta per il digiuno, gli esami biochimico-clinici dovranno essere effettuati dopo le osservazioni funzionali della quarta settimana.

I seguenti esami delle urine possono essere facoltativamente effettuati nell'ultima settimana dello studio utilizzando un volume d'urina raccolto ad orari fissi: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, albumina, glucosio e sangue-eritrociti.

Sono inoltre raccomandati studi sui marker serici delle lesioni tissutali generali. Altre determinazioni dovranno essere eseguite qualora si abbia motivo di ritenere o di sospettare che le proprietà della sostanza in esame possano alterare i profili metabolici riguardanti il calcio, il fosfato, i trigliceridi a digiuno, gli ormoni specifici, la metemoglobina e la colinesterasi. Tali parametri dovranno essere determinati per certe classi di sostanze o determinati composti specifici.

Nel complesso è opportuno adottare un approccio flessibile, che tenga conto della specie utilizzata e degli effetti osservati e/o previsti della sostanza in esame.

Se i dati storici di base risultano inadeguati, è opportuno determinare i parametri ematologici e biochimico-chimici prima dell'inizio del saggio.

1.4.3.5. Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali dello studio dovranno essere sottoposti ad una necroscopia completa, comprendente un accurato esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi, della cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali, i testicoli, gli epididimi, il timo, la milza, il cervello e il cuore di tutti gli animali saranno opportunamente sezionati e pesati quanto più rapidamente possibile onde evitarne la disidratazione.

I seguenti tessuti dovranno essere conservati nel mezzo di fissazione, più adeguato in funzione del tipo di tessuto e degli esami istopatologici previsti: tutti i tessuti recanti lesioni macroscopiche, encefalo (le regioni rappresentative comprendono cervello, cervelletto e ponte), midollo spinale, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, timo, tiroide, trachea e polmoni (conservati con insufflazione di un fissativo e successiva immersione), gonadi, organi genitali accessori (p. es. utero, prostata), vescica, linfonodi (preferibilmente un linfonodo sulla via di somministrazione e un linfonodo distante da essa, in modo da coprire gli effetti sistemici), nervi periferici (nervo sciatico o nervo tibiale), possibilmente in stretta prossimità del muscolo, e una sezione del midollo osseo (o, in alternativa, un preparato fresco di midollo osseo aspirato). In base all'esito dell'esame clinico e ad altri risultati può risultare opportuno esaminare altri tessuti. Dovranno inoltre essere conservati tutti gli organi ritenuti organi bersaglio potenziali in funzione delle proprietà note della sostanza in esame.

1.4.3.6. Esame istopatologico

Un esame istopatologico completo sarà effettuato sugli organi e i tessuti conservati di tutti gli animali del gruppo di controllo e del gruppo trattato con dosaggio elevato. Detto esame sarà esteso agli animali degli altri gruppi di dosaggio qualora nel gruppo a dosaggio elevato vengano osservate alterazioni indotte dalla sostanza.

Si procederà all'esame di tutte le lesioni macroscopiche.

Nel caso si utilizzi un gruppo satellite, un esame istopatologico dovrà essere eseguito sui tessuti e gli organi per i quali siano stati osservati effetti nei gruppi trattati.

2. DATI

Dovranno essere forniti i dati individuali di ciascun animale. Inoltre, tutti i dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti ad eutanasia nonché il momento del decesso o della soppressione di ciascun animale, il numero di animali recanti segni di tossicità, una descrizione degli effetti tossici con indicazione del momento della comparsa, della durata e della gravità di detti effetti, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesione e la percentuale di animali per ogni tipo di lesione.

Se possibile, i risultati numerici devono essere valutati sulla base di un metodo statistico adeguato e generalmente riconosciuto. I metodi statistici devono essere selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. RELAZIONE

Relazione sul saggio

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

Animali da esperimento:

- specie/ceppo utilizzati;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di alloggiamento, dieta ecc.;
- peso di ciascun animale determinato all'inizio del saggio, con cadenza settimanale nel periodo successivo e al termine del saggio.

Condizioni sperimentali:

- motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua;
- motivazione della scelta del livello di dosaggio;
- informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza e sulla preparazione della dieta, concentrazione ottenuta, stabilità e omogeneità della preparazione;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame;
- se del caso, conversione della concentrazione della sostanza somministrata con gli alimenti o con l'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno);
- informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua.

Risultati:

- peso corporeo/modificazioni del peso corporeo;
- consumo di cibo e, se del caso, consumo di acqua;
- dati concernenti la risposta tossica per sesso e per dose, compresi i segni di tossicità;
- natura, gravità e durata degli effetti clinici osservati (ed eventuale reversibilità);
- valutazione dell'attività sensoriale, della forza di prensione e dell'attività motoria;
- esami ematologici e relativi valori di riferimento;
- esami biochimico-clinici e relativi valori di riferimento;
- peso corporeo al momento della soppressione degli animali e peso degli organi;
- esito dell'esame necroscopico;
- una descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici;
- dati relativi all'assorbimento, se disponibili;
- ove del caso, elaborazione statistica dei risultati.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. RIFERIMENTI

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 407

B.8. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER INALAZIONE

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

È utile avere informazioni preliminari sulla distribuzione delle dimensioni delle particelle, la tensione di vapore, il punto di fusione, il punto di ebollizione, il punto di infiammabilità e la esplosività (se del caso) della sostanza.

Vedi anche introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Diversi gruppi di animali da esperimento sono esposti quotidianamente per un periodo determinato a concentrazioni graduate della sostanza in esame; si utilizza una concentrazione per gruppo, somministrata per 28 giorni. Se si fa uso di un veicolo per ottenere una concentrazione appropriata della sostanza in esame nell'atmosfera, si dovrà prevedere anche un gruppo di animali di controllo trattati con il veicolo. Durante il periodo di trattamento, gli animali vengono esaminati quotidianamente per rilevare i sintomi di tossicità. Gli animali che muoiono durante il saggio e quelli che sopravvivono sono sottoposti a necropsia alla fine del saggio.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.6.1. Preparazioni

Per almeno 5 giorni prima dell'esperimento gli animali sono mantenuti nelle stesse condizioni di stabulazione e di alimentazione dell'esperimento. Prima del saggio, gli animali, che dovranno essere giovani e sani, sono scelti con metodo casuale e assegnati ai vari gruppi previsti. Se necessario, alla sostanza in esame può essere aggiunto un veicolo idoneo per facilitare la generazione di una concentrazione appropriata della sostanza in esame nell'atmosfera. Se per facilitare il dosaggio si utilizza un veicolo o altri additivi, questi dovranno non produrre effetti tossici. Se appropriato, possono essere utilizzati i dati storici.

1.6.2. Condizioni per il saggio

1.6.2.1. Animali da esperimento

Salvo controindicazione, il ratto è la specie d'elezione. Si dovranno utilizzare animali giovani e sani da ceppi di laboratorio comunemente usati. All'inizio dello studio, l'intervallo di variazione ponderale degli animali usati non dovrebbe superare $\pm 20\%$ del valore medio.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ogni gruppo in esame dovranno essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso maschile e 5 di sesso femminile). Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Ove siano programmati sacrifici intermedi, il numero degli animali dovrà essere aumentato per includere quello degli animali da sacrificare prima del termine della prova. Inoltre, un gruppo satellite di

10 animali (5 animali per sesso) può essere sottoposto al trattamento con il livello superiore di dosaggio per 28 giorni ed esaminato, nei seguenti 14 giorni, per quanto riguarda la reversibilità o la persistenza o l'insorgenza ritardata degli effetti tossici. Inoltre si userà in tale caso, un gruppo satellite pure di 10 animali di controllo (5 animali per sesso).

1.6.2.3. Concentrazioni di esposizione

Sono richieste almeno tre concentrazioni con un controllo, oppure, se viene utilizzato un veicolo, un controllo del veicolo (corrispondente alla massima concentrazione del veicolo). Gli animali del gruppo di controllo dovranno essere trattati in modo identico agli animali dei gruppi trattati, ad eccezione del trattamento con la sostanza in esame. La massima concentrazione dovrebbe produrre effetti tossici, ma senza causare mortalità, o almeno causando una mortalità molto bassa. La concentrazione più bassa non dovrebbe causare alcun sintomo di tossicità. Nei casi in cui sia possibile stimare l'esposizione umana prevista, il livello di dosaggio più basso dovrebbe superare questo livello. Dal punto di vista ottimale la concentrazione intermedia dovrebbe produrre effetti tossici minimi. Nel caso in cui siano utilizzate più concentrazioni intermedie, queste dovrebbero essere intervallate in modo tale da produrre una graduazione di effetti tossici. Nei gruppi esposti alle concentrazioni bassa e intermedia e nei controlli, l'incidenza dei decessi dovrebbe essere bassa al fine di consentire una valutazione significativa dei risultati.

1.6.2.4. Tempo di esposizione

La durata dell'esposizione giornaliera dovrà essere di 6 ore. Tuttavia, per esigenze specifiche, si possono utilizzare esposizioni di diversa durata.

1.6.2.5. Apparecchiature

Gli animali dovranno essere esposti al composto in dispositivi per l'inalazione appositamente progettati per consentire un flusso dinamico dell'aria di almeno 12 ricambi l'ora per garantire un adeguato contenuto di ossigeno e un'atmosfera uniformemente distribuita. Qualora sia usata una camera, essa deve essere progettata in modo da minimizzare l'affollamento degli animali da esperimento e al tempo stesso rendere massima l'esposizione mediante inalazione alla sostanza in esame. Come regola generale per garantire la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» complessivo degli animali di saggio non dovrebbe superare il 5 % di quello della camera di saggio. Si può ricorrere ad una esposizione oro-nasale, della sola testa, oppure di tutto il corpo in camera individuale; le prime due modalità d'esposizione renderanno minima l'assunzione delle sostanze attraverso altre vie.

1.6.2.6. Periodo di osservazione

Durante l'intero trattamento e il periodo di recupero, gli animali dovranno essere esaminati quotidianamente per rilevare i segni di tossicità. Il momento del decesso e il momento in cui si manifestano e scompaiono i sintomi di tossicità dovranno essere registrati.

1.6.3. Procedimento

Gli animali vengono esposti giornalmente alla sostanza in esame per 5-7 giorni alla settimana per un periodo di 28 giorni. Gli animali di ogni gruppo satellite, previsto per proseguire le osservazioni, dovranno essere tenuti per altri 14 giorni, senza alcun trattamento, al fine di rilevare la scomparsa oppure la persistenza degli effetti tossici. L'esperimento dovrà essere effettuato ad una temperatura di $22\text{ C} \pm 3\text{ C}$.

Dal punto di vista ottimale, l'umidità relativa dovrà essere mantenuta tra il 30 e il 70 % ma, in taluni casi (ad esempio prove di alcuni aerosol), ciò può non essere realizzabile. Mantenendo una leggera pressione negativa all'interno della camera ($\leq 5\text{ mm d'acqua}$) si impedirà il trafileamento della sostanza in esame nell'area circostante. Durante l'esposizione, la somministrazione di cibo e acqua dovrebbe essere sospesa.

Dovrà essere realizzato un sistema dinamico d'inalazione con un adeguato sistema analitico di controllo della concentrazione. Si raccomanda di effettuare un esperimento di prova per stabilire le concentrazioni idonee di esposizione. La velocità di flusso dell'aria dovrà essere regolata in modo da rendere uniformi le condizioni nella camera di esposizione. Il sistema dovrebbe consentire di raggiungere al più presto possibile le condizioni d'esposizione stabili.

Dovranno essere misurati o controllati:

(a) la velocità del flusso d'aria (in continuo);

(b) la concentrazione effettiva della sostanza in esame nella zona di respirazione. Durante il periodo giornaliero di esposizione, la concentrazione non dovrà variare oltre il $\pm 15\%$ del valore medio. Tuttavia, nel caso di alcuni aerosol, questo livello di controllo potrebbe non essere realizzabile, e sarebbe quindi accettabile un intervallo più ampio. Per tutta la durata dello studio, le concentrazioni dovranno essere mantenute per quanto possibile costanti da un giorno all'altro. Per gli aerosol, si dovrà eseguire almeno un'analisi delle dimensioni di particelle per gruppo di prova e per settimana.

(c) Temperatura e umidità, in continuo se possibile.

Durante e dopo l'esposizione si procede all'effettuazione e alla registrazione sistematica delle osservazioni; registri individuali dovranno essere mantenuti per ciascun animale. Tutti gli animali dovranno essere esaminati giornalmente e dovranno essere registrati i sintomi di tossicità, compresi il momento del loro insorgere, il loro grado e la loro durata. Le osservazioni effettuate dovrebbero comprendere le alterazioni della cute e del pelo, degli occhi, delle membrane mucose e dei sistemi respiratorio, circolatorio, nervoso utonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento dell'animale. La misura del peso degli animali dovrà essere effettuata ogni settimana. Si raccomanda, inoltre, che anche il consumo di alimento sia misurato ogni settimana. L'osservazione regolare degli animali è necessaria per minimizzare la perdita di animali da studiare causata da cannibalismo, autolisi dei tessuti o errata collocazione. Al termine dello studio, gli animali sopravvissuti, esclusi quelli del gruppo satellite, vengono sottoposti ad esame necroscopico. Gli animali moribondi e gli animali in stato di grave sofferenza o dolore dovrebbero essere rimossi appena notati, soppressi umanamente e sottoposti a necropsia. Al termine del saggio tutti gli animali, compresi quelli di controllo, saranno sottoposti ai seguenti esami:

1. ematologia, comprendente almeno l'ematocrito, la concentrazione di emoglobina, la conta degli eritrociti, la conta totale e differenziale dei leucociti e una misura del potenziale di coagulazione;

2. biochimica clinica del sangue, comprendente almeno un parametro della funzionalità epatica e renale nel siero: alanina aminotransferasi (prima conosciuta come glutammico-piruvico transaminasi), aspartato aminotransferasi (prima conosciuta come glutammico-ossalacetico transaminasi), azoto ureico, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine sieriche totali.

Altre determinazioni che possono risultare necessarie per una adeguata valutazione tossicologica, comprendono il calcio, il fosforo, il cloruro, il sodio, il potassio, il glucosio a digiuno, l'analisi dei lipidi, gli ormoni, l'equilibrio acido/base, la metaemoglobina, l'attività colinesterasica.

Ove necessario, si possono effettuare altre analisi biochimico-cliniche per estendere l'indagine degli effetti osservati.

1.6.3.1. Necropsia

Tutti gli animali usati nello studio dovrebbero essere sottoposti a necropsia completa. Per evitare la disidratazione, almeno il fegato, i reni, le ghiandole surrenali, i polmoni e i testicoli dovrebbero essere pesati a umido appena possibile dopo la dissezione. Organi e tessuti (il tratto respiratorio, fegato, reni, milza, testicoli, ghiandole surrenali, cuore e qualsiasi organo presentante lesioni macroscopiche o variazioni delle dimensioni) dovrebbero essere conservati in un materiale idoneo per un eventuale futuro esame istopatologico. I polmoni dovrebbero essere

asportati intatti, pesati e trattati con un fissatore idoneo ad assicurare che la struttura dei polmoni venga mantenuta.

1.6.3.2. Esame istopatologico

Gli organi e i tessuti degli animali del gruppo trattato con la concentrazione più elevata e del gruppo di controllo dovranno essere sottoposti ad esame istologico. Gli organi e i tessuti che presentano alterazioni attribuibili alla sostanza in esame, somministrata al più alto livello di dosaggio, dovranno essere esaminati in tutti i gruppi trattati con i dosaggi inferiori. Gli animali di ogni gruppo satellite dovranno essere sottoposti ad esame istologico, in particolare per gli organi e i tessuti che risultano colpiti da effetti tossici negli altri gruppi trattati.

2. DATI

I risultati dovranno essere riassunti sotto forma tabellare indicante, per ogni gruppo trattato, il numero di animali all'inizio e il numero di animali che presentano ciascun tipo di lesione. Tutti i risultati osservati dovrebbero essere valutati secondo un adeguato metodo statistico. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico riconosciuto.

3. RELAZIONE

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

- specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta, ecc.;
- condizioni del saggio:

Descrizione dell'apparecchiatura di esposizione, incluso il disegno, tipo, dimensioni, la fonte d'aria, il sistema per la formazione degli aerosol, il metodo di condizionamento dell'aria, il trattamento dell'aria di scarico e il metodo di stabulazione degli animali in una camera sperimentale, quando questa venga usata. Dovrebbe essere fornita una descrizione della strumentazione usata per misurare la temperatura, l'umidità e, se del caso, la stabilità delle concentrazioni di aerosol o la distribuzione delle dimensioni delle particelle. Dati relativi all'esposizione:

Essi dovrebbero essere tabulati e presentati con valori medi e con una misura della variabilità (ad esempio deviazione standard) e dovrebbero includere:

- a) velocità del flusso d'aria attraverso l'apparecchiatura di inalazione;
 - b) temperatura e umidità dell'aria;
 - c) concentrazioni nominali (quantitativo globale della sostanza in esame introdotta nel dispositivo di inalazione diviso per il volume dell'aria);
 - d) tipo di veicolo, se usato;
 - e) concentrazioni effettive nella zona di respirazione;
 - f) diametro aerodinamico mediano in massa (DAMM) e deviazione standard geometrica (DSG);
- dati relativi agli effetti tossici per sesso e per concentrazione;
 - momento del decesso durante lo studio, o se gli animali sono sopravvissuti sino al suo termine;
 - descrizione di effetti tossici o altri effetti; livello senza effetti;
 - momento in cui è stato rilevato ciascun sintomo anormale e suo decorso;
 - dati relativi al consumo di alimento e al peso corporeo;
 - analisi ematologiche effettuate e loro risultati;
 - analisi biochimiche-cliniche effettuate e loro risultati;
 - risultati della necropsia;
 - descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici;
 - elaborazione statistica dei risultati, ove possibile;
 - discussione dei risultati;

- interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto E)

B.9 TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA CUTANEA

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame è applicata ogni giorno sulla pelle di alcuni gruppi di animali da esperimento, in dosi graduate, un livello di dose per gruppo, per un periodo di 28 giorni. Durante il periodo di applicazione, gli animali vengono osservati quotidianamente per rilevare i sintomi di tossicità. Si sottopongono a necropsia gli animali morti durante la prova e al termine del saggio vengono sottoposti a necropsia gli animali sopravvissuti.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.6.1. Preparazioni

Per un periodo di almeno 5 giorni prima della prova gli animali sono mantenuti nelle stesse condizioni di stabulazione e di alimentazione del saggio. Prima del saggio gli animali, che dovranno essere giovani e sani, sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi previsti per il trattamento e per il controllo. Poco prima dell'esperimento si effettua il taglio del pelo nella parte dorsale del corpo degli animali. Si può procedere alla rasatura, ma essa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima dell'esperimento. Di norma è necessario ripetere il taglio o la rasatura a intervalli di circa una settimana. Durante il taglio o la rasatura si dovrà badare a non ledere la cute dell'animale. Per l'applicazione della sostanza in esame, si dovrebbe preparare almeno il 10 % della superficie corporea. Nel determinare l'entità dell'area da preparare e le dimensioni della copertura è opportuno tenere presente il peso dell'animale. Le sostanze solide, che possono essere ridotte in polvere se appropriato, dovranno essere inumidite sufficientemente con acqua o, se necessario, con un veicolo adatto ad assicurare un buon contatto con la pelle. In generale le sostanze liquide sono saggiate in forma non diluita. Dal punto di vista ottimale, applicazioni quotidiane vengono effettuate sulla base di 5-7 giorni per settimana.

1.6.2. Condizioni per il saggio

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Possono essere utilizzati ratti adulti, conigli o porcellini d'India. Si possono utilizzare altre specie animali, ma il loro uso dovrà essere giustificato. All'inizio dello studio l'intervallo di variazione di peso degli animali non dovrebbe superare $\pm 20\%$ del valore medio.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ciascun livello di dosaggio dovrebbero essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso

femminile e 5 di sesso maschile) con cute sana. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Qualora siano stati programmati sacrifici intermedi di alcuni animali, il numero degli animali dovrà essere aumentato per includere quello degli animali da sacrificare prima del termine della prova. Inoltre, un altro gruppo (gruppo satellite) di 10 animali (5 animali per sesso) può essere sottoposto al trattamento con il livello massimo di dosaggio per 28 giorni e tenuto in osservazione per 14 giorni dopo il trattamento per rilevare la reversibilità, la persistenza o l'insorgenza ritardata degli effetti tossici. Inoltre si utilizzerà in tale caso pure un gruppo satellite di 10 animali di controllo (5 animali per sesso).

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

Sono richiesti almeno 3 livelli di dosaggio, almeno 6 ore al giorno, con un gruppo di controllo oppure, nel caso venga usato un veicolo, con un gruppo di controllo del veicolo. L'applicazione della sostanza in esame dovrebbe essere effettuata ogni giorno alla stessa ora e modificata ad intervalli (settimanali e bisettimanali) al fine di mantenere un livello di dosaggio costante in funzione del peso dell'animale. Gli animali del gruppo di controllo dovranno essere trattati in modo identico agli animali del saggio, ad eccezione che per l'applicazione delle sostanze da saggiare.

Se, per facilitare il dosaggio, viene utilizzato un veicolo, al gruppo di controllo dovrà essere somministrato il veicolo allo stesso modo che ai gruppi trattati e nella stessa quantità somministrata al gruppo con il dosaggio più elevato. Il livello di dosaggio più elevato della sostanza in esame dovrebbe causare effetti tossici ma senza causare mortalità oppure causando una mortalità molto limitata. Il livello di dosaggio più basso non dovrebbe provocare alcun sintomo di tossicità. Nei casi in cui vi sia una stima utilizzabile dell'esposizione umana, il livello di dosaggio più basso dovrebbe superarla. Dal punto di vista ottimale, il livello intermedio dovrebbe provocare effetti tossici osservabili minimi. Nei casi in cui siano usati più livelli di dosaggio intermedi, essi dovrebbero essere intervallati al fine di causare una graduazione di effetti tossici. Nei gruppi a livello di dosaggio basso e medio e di controllo, l'incidenza dei decessi dovrebbe essere bassa per consentire una valutazione significativa dei risultati. Se l'applicazione della sostanza in esame dovesse causare una grave irritazione della cute, sarà opportuno ridurre le concentrazioni, e ciò può causare una diminuzione oppure l'assenza degli altri effetti tossici al livello di dosaggio più elevato. Inoltre, se la cute è stata gravemente danneggiata, può essere necessario interrompere il saggio e iniziarne uno nuovo a concentrazioni più basse.

1.6.2.4. Saggio limite

Qualora un saggio preliminare, effettuato con un livello di dosaggio di 1 000 mg/kg di peso corporeo, oppure con una dose superiore in relazione all'eventuale esposizione umana, se nota, non causi effetti tossici, ulteriori saggi possono essere considerati non necessari.

1.6.2.5. Periodo di osservazione

Gli animali da esperimento dovrebbero essere esaminati quotidianamente al fine di rilevare i segni della tossicità. Il momento del decesso e quello in cui appaiono e scompaiono i sintomi di tossicità dovrebbero essere registrati.

1.6.3. Procedimento

Ogni gabbia dovrebbe contenere un solo animale. Da un punto di vista ottimale, la sostanza in esame viene applicata agli animali 7 giorni la settimana per un periodo di 28 giorni. Gli animali di ogni eventuale gruppo satellite previsto per proseguire le osservazioni dovrebbero essere tenuti per altri 14 giorni, senza subire trattamenti, al fine di rilevare l'eventuale guarigione o la persistenza degli effetti tossici. La durata dell'esposizione dovrebbe essere almeno di 6 ore/giorno.

La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su un'area pari a circa il 10 % della superficie corporea totale. Per le sostanze altamente tossiche, la superficie coperta può essere inferiore, ma la maggior parte dell'area trattata dovrebbe essere ricoperta da uno strato per quanto possibile sottile e uniforme. Durante il periodo di esposizione, la sostanza in esame viene tenuta a contatto della cute mediante una garza porosa e un cerotto non irritante. La parte su cui viene applicata la sostanza dovrà essere ulteriormente coperta in modo opportuno per tenere ferma la garza e la sostanza in esame e affinché gli animali non possano ingerire la sostanza stessa. Dispositivi per la limitazione dei movimenti possono essere utilizzati per impedire agli animali di ingerire la sostanza in esame, ma non è consigliabile l'immobilizzazione completa dell'animale. Come alternativa si può usare un «dispositivo protettivo a collare».

Alla fine del periodo di esposizione, la sostanza residua dovrà essere rimossa utilizzando acqua, se possibile, o altri prodotti idonei per la pulizia della pelle. Tutti gli animali dovranno essere esaminati quotidianamente e dovranno essere registrati i segni di tossicità, inclusi il momento dell'insorgenza, il loro grado e durata. Le osservazioni dovrebbero includere le alterazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle membrane mucose, e anche dei sistemi respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento dell'animale. La misura del peso degli animali dovrà essere effettuata ogni settimana. Si raccomanda, inoltre, che il consumo sia anche misurato ogni settimana. L'esame periodico degli animali è necessario per impedire la perdita degli animali dello studio, dovuta a cause come cannibalismo, autolisi dei tessuti o errata collocazione. Al termine del saggio, tutti gli animali sopravvissuti, ad eccezione del gruppo satellite, sono sottoposti a necropsia. Gli animali moribondi e gli animali in condizioni di grave sofferenza o dolore dovranno essere rimossi appena notati, soppressi umanamente e sottoposti a necropsia. Al termine del saggio tutti gli animali, compresi quelli di controllo, saranno sottoposti ai seguenti esami:

(i) ematologia, comprendente almeno l'ematocrito, la concentrazione di emoglobina, la conta degli eritrociti, la conta totale e differenziale dei leucociti e una misura del potenziale di coagulazione;

(ii) biochimica clinica del sangue, comprendente almeno un parametro della funzionalità epatica e renale nel siero: alanina aminotransferasi (prima conosciuta come glutammico-piruvico transaminasi), aspartato aminotransferasi (prima conosciuta come glutammico-ossalacetico transaminasi), azoto ureico, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine sieriche totali.

Altre determinazioni, che possono risultare necessarie per un'adeguata valutazione tossicologica, comprendono il calcio, il fosforo, il cloruro, il sodio, il potassio, il glucosio a digiuno, l'analisi dei lipidi, gli ormoni, l'equilibrio acido/base, la metaemoglobina, l'attività colinesterasica.

Per estendere l'indagine degli effetti osservati, se necessario, si possono utilizzare ulteriori esami biochimico-clinici.

1.6.4. Necropsia

Tutti gli animali dello studio dovranno essere sottoposti a necropsia completa. Per evitare la disidratazione, il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovrebbero essere pesati umidi al più presto possibile dopo la dissezione. Gli organi e i tessuti, cioè la cute normale e trattata, il fegato, i reni, la milza, i testicoli, le ghiandole surrenali, il cuore e gli organi bersaglio (cioè gli organi che presentano lesioni macroscopiche o variazioni di dimensioni) dovranno essere conservati in un mezzo adatto per l'eventuale futuro esame istopatologico.

1.6.5. Esame istopatologico

Gli organi e i tessuti degli animali del gruppo ad alto dosaggio e del gruppo di controllo opportunamente preservati dovranno essere sottoposti ad esame istologico. Gli organi e i tessuti che presentano lesioni attribuibili alla sostanza in esame somministrata al dosaggio più elevato dovranno essere esaminati anche per i gruppi a dosaggio inferiore. Gli animali dell'eventuale

gruppo satellite dovranno essere sottoposti ad esame istologico, in particolare per gli organi e i tessuti che risultano colpiti da effetti tossici negli altri gruppi trattati.

2. DATI

I risultati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo trattato, il numero di animali all'inizio del saggio e il numero di animali che mostra ciascun tipo di lesione. Tutti i risultati osservati dovranno essere valutati con un adeguato metodo statistico. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico riconosciuto.

3. RELAZIONE

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

- dati sugli animali (specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.);
- condizioni di prova (incluso il tipo di medicazione: occlusiva o non occlusiva);
- livello di dosaggio (incluso il veicolo, se usato) e concentrazioni;
- livello senza effetti, dove possibile;
- effetti tossici per sesso e dosaggio;
- il momento del decesso durante il saggio, oppure se gli animali sono sopravvissuti sino al termine;
- effetti tossici o altri effetti;
- momento dell'osservazione di ciascun sintomo anomalo e suo successivo decorso;
- dati relativi al consumo di alimenti e al peso corporeo;
- esami ematologici effettuati e loro risultati;
- esami biochimico-clinici effettuati e loro risultati;
- risultati della necropsopia;
- descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici;
- elaborazione statistica dei risultati, ove possibile;
- discussione dei risultati;
- interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto E)

B. 10. MUTAGENICITA' – TEST IN VITRO DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA

NEI MAMMIFERI

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 473, In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 INTRODUZIONE

Il saggio in vitro di aberrazione cromosomica è destinato ad identificare gli agenti che causano aberrazioni cromosomiche strutturali in una coltura di cellule di mammifero (1)(2)(3). Le aberrazioni strutturali possono essere di due tipi: cromosomiche o cromatidiche. La maggior parte dei mutageni chimici induce aberrazioni cromatidiche, benché si verifichino anche aberrazioni cromosomiche. Un aumento della poliploidia può indicare che una sostanza chimica ha la capacità di indurre aberrazioni numeriche. Questo metodo tuttavia non è inteso a misurare le aberrazioni numeriche e non viene usato di norma per tale scopo. Le mutazioni cromosomiche e i fenomeni ad esse correlati sono causa di molte malattie genetiche umane e vi sono prove concrete che mutazioni cromosomiche e fenomeni ad esse correlati, che causano alterazioni degli oncogeni e dei geni soppressori dei tumori nelle cellule somatiche sono implicati nella comparsa delle neoplasie umane come in quelle sperimentalmente indotte negli animali da laboratorio.

Nei test in vitro sulle aberrazioni cromosomiche si possono usare colture di linee cellulari stabilizzate, ceppi cellulari o colture cellulari primarie. Le cellule sono scelte in funzione della capacità di crescita in coltura, della stabilità del cariotipo, del numero e della diversità dei cromosomi e della frequenza di aberrazioni cromosomiche spontanee.

I test in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica. Tale sistema di attivazione metabolica non può simulare perfettamente le condizioni in vivo nel mammifero. Si evitino accuratamente condizioni che porterebbero a risultati positivi che non riflettono una mutagenicità intrinseca ma che possono avere origine da cambiamenti di pH o dell'osmolalità o da livelli elevati di citotossicità (4)(5).

Questi test sono utilizzati per individuare potenziali mutageni e cancerogeni per i mammiferi. Molti composti che risultano positivi al test sono cancerogeni per i mammiferi; tuttavia la correlazione tra il test e la cancerogenicità non è assoluta: dipende dalla classe chimica e vi sono sempre più elementi che inducono a ritenere che esistono cancerogeni non rivelati da questi test, perchè sembrano agire attraverso meccanismi diversi dal danno diretto al DNA.

Vedi anche Introduzione generale parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Aberrazione cromatidica: danno cromosomico strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromatide o nella rottura e ricongiunzione di cromatidi.

Aberrazione cromosomica: alterazione cromosomica strutturale, che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatidi in uno stesso punto.

Endoriduplicazione: processo nel quale, dopo una fase S di replicazione del DNA, il nucleo non inizia la mitosi ma inizia una nuova fase S. Ne risultano cromosomi con 4, 8, 16, . . . cromatidi.

Salto (gap): lesione acromatica, di ampiezza inferiore a un cromatide, con minimo disallineamento dei cromatidi.

Coefficiente mitotico: numero delle cellule in metafase diviso per il numero totale di cellule della popolazione; costituisce un'indicazione del grado di proliferazione della popolazione cellulare.

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caratteristico della specie.

Poliploidia: numero di cromosomi multiplo superiore a due del numero aploide (cioè $3n$, $4n$ ecc.).

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase, che si presenta con delezioni, perdita di segmenti, riordinamenti intercromosomici e intracromosomici.

1.3 PRINCIPIO METODOLOGICO

L'azione della sostanza in esame è saggiata sulle colture cellulari, con e senza attivazione metabolica. Dopo l'esposizione alla sostanza in esame, le colture cellulari sono trattate, a determinati intervalli, con un inibitore della metafase (p.es. Colcemid® o colchicina), raccolte, sottoposte a un processo di colorazione e le cellule in metafase sono esaminate al microscopio per determinare la presenza di aberrazioni cromosomiche.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 Preparazioni

1.4.1.1 *Cellule*

Si possono usare varie linee cellulari, ceppi o colture cellulari primarie, fra cui cellule umane (p.es. fibroblasti del criceto cinese, linfociti del sangue periferico umano o di altri mammiferi).

1.4.1.2 *Terreni e condizioni di coltura*

Si usino terreni di coltura e condizioni di incubazione (recipienti per coltura, concentrazione di CO_2 , temperatura e umidità) adeguati alle colture. Si controlli periodicamente la stabilità del numero modale dei cromosomi e l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle linee cellulari stabilizzate e nei ceppi; non si usino ceppi contaminati. Dovrebbero essere note la durata normale del ciclo cellulare e le condizioni di coltura utilizzate.

1.4.1.3 *Preparazione delle colture*

Linee cellulari stabilizzate e ceppi: le cellule provenienti da colture primarie vengono inoculate in un terreno di coltura ad una densità tale da impedire che le colture raggiungano la confluenza prima della raccolta, e incubate a 37°C.

Linfociti: sangue intero trattato con un anticoagulante (p.es. eparina) o linfociti isolati, prelevati da soggetti sani, sono posti in un terreno di coltura contenente un mitogeno (p.es. fitoemoagglutinina) e incubati a 37°C.

1.4.1.4 *Attivazione metabolica*

Le cellule dovrebbero essere esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un adeguato sistema di attivazione metabolica. Il sistema più comunemente usato è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9) ricavata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici, per esempio: Aroclor 1254 (6)(7)(8)(9), o con un composto di fenobarbitone e β -naftoflavone (10)(11)(12).

La frazione post-mitocondriale viene di solito usata a concentrazioni comprese tra 1 e 10% v/v nel terreno di coltura dell'ultimo test. Le condizioni di un sistema di attivazione metabolica dipendono dalla classe chimica della sostanza in esame. In alcuni casi può essere opportuno utilizzare varie concentrazioni della frazione post-mitocondriale.

Vari nuovi procedimenti, tra cui la creazione di linee cellulari modificate mediante ingegneria genetica che esprimono enzimi attivatori specifici, possono fornire il potenziale di attivazione endogena. La scelta delle linee cellulari deve essere scientificamente motivata (p.es. in funzione dell'importanza dell'isoenzima del citocromo P450 nel metabolismo della sostanza in esame).

1.4.1.5 *Sostanza in esame /Preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

1.4.2 **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1 *Solvente/mezzo disperdente*

Il solvente/mezzo disperdente non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame e deve essere compatibile con la sopravvivenza delle cellule e con l'azione di S9. 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. Nell'esame di sostanze instabili in acqua, si usi un solvente organico anidro. L'acqua può essere rimossa mediante un setaccio molecolare.

1.4.2.2 *Concentrazioni di esposizione*

Fra i criteri da considerare nel determinare la concentrazione massima si citano la citotossicità, la solubilità nel sistema di prova e le variazioni di pH o di osmolalità.

La citotossicità deve essere determinata con e senza attivazione metabolica nel test principale, sulla base di un'indicatore adeguato dell'integrità e della moltiplicazione cellulare, come il grado di confluenza, il conteggio delle cellule vitali o il coefficiente mitotico. Può essere utile determinare la citotossicità e la solubilità in un esperimento preliminare.

Si usino almeno tre concentrazioni analizzabili. In caso di sostanze citotossiche, le concentrazioni devono andare dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica; le concentrazioni devono cioè essere di norma separate al massimo da un fattore compreso tra 2 e $\sqrt{10}$. Al momento della raccolta la concentrazione più elevata deve presentare una riduzione significativa (superiore al 50%) del grado di confluenza, del numero delle cellule o del coefficiente mitotico. Il coefficiente mitotico è solo una misura indiretta di effetti citotossici/citostatici e dipende dal tempo trascorso dopo il trattamento. È tuttavia accettabile per colture in sospensione, per le quali altre misure della tossicità possono essere complesse e poco pratiche. Dati relativi alla cinetica cellulare, per esempio il tempo medio di moltiplicazione, possono fornire informazioni supplementari. Il tempo medio di moltiplicazione tuttavia è una media generale, che non sempre rivela l'esistenza di sottopopolazioni a ritardo, e anche piccoli aumenti di esso possono essere associati ad un ritardo sostanziale del tempo di comparsa delle aberrazioni.

Per sostanze a basso grado di citotossicità la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml o 0,01 M (si scelga il valore più basso).

Per sostanze difficilmente solubili e non tossiche a concentrazioni inferiori al limite di solubilità, la dose massima dovrebbe essere una concentrazione superiore al limite di solubilità nell'ultimo terreno di coltura, al termine del trattamento. In alcuni casi (per esempio quando si verifica tossicità solo a concentrazioni superiori alla concentrazione minima insolubile) è opportuno eseguire prove a più di una concentrazione, con precipitazione visibile. Può essere utile valutare la solubilità all'inizio e al termine del trattamento, perché questa può variare nel corso dell'esposizione durante il saggio, per la presenza di cellule, S9, siero ecc. L'insolubilità può essere rilevata ad occhio nudo. Il precipitato non deve interferire con la valutazione.

1.4.2.3 *Controlli negativi e positivi*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente o mezzo disperdente) trattati in parallelo, con e senza attivazione metabolica. Quando si usa l'attivazione metabolica, la sostanza usata per i controlli positivi deve esigere attivazione per dare una risposta mutagenica.

Come controllo positivo si utilizzi un clastogeno noto, a livelli ai quali ci si attende un aumento riproducibile e individuabile rispetto ai valori normali, che dimostri la sensibilità del test.

La concentrazione del controllo positivo deve essere tale che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. Esempi di sostanze di controllo positive:

Condizione di attivazione metabolica	Sostanza	No. CAS	No. EINECS
Assenza di attivazione metabolica esogena	Metansolfonato di metile	66-27-3	200-625-0
	Metansolfonato di etile	62-50-0	200-536-7
	Etilnitrosoarea	759-73-9	212-072-2
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitrochinolina-N-ossido	56-57-5	200-281-1
Presenza di attivazione metabolica esogena	Benzo[a]pirene	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamide	50-18-0	200-015-4
	Ciclofosfamide monoidrato	6055-19-2	

Si possono usare altre adeguate sostanze per i controlli positivi. Si usino, se disponibili, sostanze di una classe chimica correlata.

Si effettuino anche controlli negativi, con solvente o mezzo disperdente usati da soli sul terreno di coltura; i controlli vanno trattati come le colture di trattamento, per ogni fase di raccolta. Si proceda inoltre a controlli non trattati, salvo che dati precedenti provino che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

1.4.3 **Procedura**

1.4.3.1 *Trattamento con la sostanza in esame*

Le cellule in proliferazione sono trattate con la sostanza in esame in presenza e in assenza di un sistema di attivazione metabolica. Il trattamento dei linfociti deve iniziare circa 48 ore dopo la stimolazione mitogenica.

1.4.3.2 Dovrebbero essere usate di norma colture in doppio per ogni concentrazione, anche per le colture di controllo con solo solvente. Se esistono precedenti dati che provano che le variazioni tra colture in doppio sono minime(13)(14), si può accettare l'uso di una sola coltura per concentrazione.

I test con sostanze gassose o volatili devono essere condotti con metodi adeguati, per esempio in recipienti di coltura ermetici (15)(16).

1.4.3.3 *Raccolta delle colture*

Nel primo esperimento si esponano le cellule alla sostanza in esame, sia con che senza attivazione metabolica, per 3-6 ore e si proceda al campionamento quando sia trascorso un periodo equivalente a circa una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale dall'inizio del trattamento(12). Se i risultati sono negativi, sia con che senza attivazione, si esegua un ulteriore esperimento senza attivazione, con trattamento continuo fino al campionamento, dopo un periodo equivalente a circa una volta e mezzo la durata del ciclo cellulare normale. Alcune sostanze chimiche possono essere individuate più facilmente con tempi di trattamento/ campionamento superiori a una volta e mezzo la durata del ciclo cellulare. I risultati negativi nei test con attivazione metabolica devono essere confermati caso per caso. Se non si ritiene necessaria la conferma dei risultati negativi, se ne fornisca la motivazione.

1.4.3.4 *Preparazione dei cromosomi*

Le colture cellulari sono trattate con Colcemid® o colchicina, di norma per un periodo variabile da una a tre ore prima della raccolta. Ogni coltura cellulare viene raccolta e trattata separatamente per la preparazione dei cromosomi. La preparazione dei cromosomi comprende il trattamento ipotonico delle cellule, il fissaggio e la colorazione.

1.4.3.5 *Analisi*

Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati individualmente prima dell'esame al microscopio. Poiché le procedure di fissaggio provocano spesso la rottura di una parte delle cellule in metafase, con perdita di cromosomi, le cellule classificate devono contenere un numero di centromeri pari al numero modale ± 2 per tutti i tipi di cellule. Per ogni concentrazione e per ogni controllo si devono valutare almeno 200 cellule in metafase ben distribuite e adeguatamente suddivise, se possibile tra le prove in doppio. Tale numero può essere ridotto quando si osserva un gran numero di aberrazioni.

Anche se il test è destinato a rivelare aberrazioni cromosomiche strutturali, è importante registrare eventuali casi di poliploidia e di endoriduplicazione.

2. **RISULTATI**

2.1 **TRATTAMENTO DEI RISULTATI**

L'unità sperimentale è la cellula; pertanto si deve valutare la percentuale di cellule che presentano una o più aberrazioni cromosomiche strutturali. Per le colture sperimentali e per le colture di controllo si indichino i vari tipi di aberrazioni cromosomiche strutturali, con numero e frequenza. I salti vanno registrati separatamente e indicati nella relazione, ma non vanno inclusi nella frequenza totale delle aberrazioni.

Si riportino anche le misure di citotossicità condotte in parallelo per tutte le colture trattate e i controlli negativi nei principali test di aberrazione.

I dati saranno presentati separatamente per le singole colture e riassunti in tabelle.

Non è necessario verificare le risposte positive inequivocabili. I risultati ambigui devono essere chiariti mediante prove ulteriori, preferibilmente modificando le condizioni di esperimento. La necessità di confermare i risultati negativi è stata discussa al punto 1.4.3.3. Nei test successivi si dovrebbero modificare i parametri di studio, per estendere la gamma delle condizioni valutate. Fra i parametri di studio modificabili si citano l'intervallo fra i livelli di concentrazione e le condizioni di attivazione metabolica.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento correlato alla concentrazione o un aumento riproducibile del numero di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche. Si consideri in primo luogo la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (3)(13), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva.

Un aumento del numero di cellule poliploidi può significare che la sostanza in esame è in grado di inibire processi mitotici e di indurre aberrazioni numeriche nei cromosomi. Un aumento del numero di cellule con cromosomi endoriduplicati può indicare che la sostanza in esame è in grado di inibire il ciclo cellulare (17)(18).

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati palesemente positivi o negativi, ma in alcuni casi i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio di aberrazione cromosomica in vitro indicano che la sostanza in esame induce aberrazioni cromosomiche strutturali in colture di cellule somatiche di mammifero. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni di test, la sostanza in esame non induce aberrazioni cromosomiche in colture di cellule somatiche di mammifero.

3. RELAZIONE

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente

- motivazione della scelta del mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/ mezzo disperdente, se nota;

Cellule:

- tipo e origine delle cellule;
- caratteristiche del cariotipo e idoneità del tipo di cellula usato;
- assenza di micoplasma, se del caso;
- informazioni sulla durata del ciclo cellulare;
- sesso dei donatori di sangue, sangue intero o linfociti isolati, mitogeno usato;
- eventuale numero dei trasferimenti;
- metodi usati per la conservazione della coltura cellulare, se del caso;
- numero modale dei cromosomi.

Condizioni di esperimento:

- natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata di esposizione delle cellule;
- criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture, p.es. dati sulla citotossicità e sui limiti di solubilità, se disponibili;
- composizione del terreno di coltura, concentrazione di CO₂ se del caso;
- concentrazione della sostanza in esame;
- volume del mezzo disperdente e della sostanza in esame aggiunti;
- temperatura di incubazione;
- tempo di incubazione;
- durata del trattamento;
- densità delle cellule al momento dell'inoculazione, se del caso;
- tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica, compresi i criteri di accettabilità;
- controlli positivi e negativi;
- metodi di preparazione dei vetrini;
- criteri di conteggio delle aberrazioni;
- numero di metafasi analizzate;
- metodi di misura della tossicità;
- criteri in base ai quali i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

- indizi di tossicità, p.es. grado di confluenza, dati sul ciclo cellulare, conta delle cellule, coefficiente mitotico;
- segni di precipitazione;
- dati sul pH e sull'osmolalità del terreno di trattamento, se determinati;
- definizione delle aberrazioni, compresi i salti;
- numero di cellule con aberrazioni cromosomiche e tipi di aberrazioni, indicati separatamente per ciascuna coltura trattata e di controllo;
- eventuali cambiamenti di ploidia;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- eventuali analisi statistiche;
- dati sui controlli negativi (solvente/ mezzo disperdente) e positivi paralleli;
- precedenti dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi, con variazioni, medie e deviazioni standard.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

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

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

B.11. MUTAGENICITA' – TEST IN VIVO DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUL MIDOLLO

OSSEO DI MAMMIFERI

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 INTRODUZIONE

I test di aberrazione cromosomica in vivo nei mammiferi sono destinati ad individuare aberrazioni cromosomiche strutturali indotte dalla sostanza in esame nelle cellule del midollo osseo di animali, di solito roditori (1)(2)(3)(4). Le aberrazioni cromosomiche strutturali possono essere di due tipi: cromosomiche o cromatidiche. Un aumento della poliploidia può significare che una sostanza chimica è in grado di indurre aberrazioni numeriche. La maggior parte dei mutageni chimici induce aberrazioni cromatidiche, ma si verificano anche aberrazioni cromosomiche. Le mutazioni cromosomiche e i fenomeni ad esse correlati sono causa di molte malattie genetiche umane e vi sono prove concrete che mutazioni cromosomiche e fenomeni ad esse correlati, che causano alterazioni degli oncogeni e dei geni soppressori di tumori, sono implicati nella comparsa delle neoplasie umane e di quelle sperimentalmente indotte negli animali da laboratorio.

Per i test si usano solitamente roditori. Il midollo osseo è il tessuto bersaglio, in quanto è altamente vascolarizzato e contiene una popolazione di cellule a ciclo rapido, che possono essere agevolmente isolate e trattate. Altre specie e altri tessuti bersaglio non sono oggetto della presente sperimentazione.

Il test di aberrazione cromosomica è particolarmente idoneo a valutare il rischio mutagenico, in quanto permette di considerare fattori del metabolismo in vivo, aspetti farmacocinetici e processi di riparazione del DNA, che peraltro possono variare in funzione della specie e del tipo di tessuto. Un test in vivo è utile anche per verificare l'effetto mutageno rivelato da un test in vitro.

Se è evidente che la sostanza in esame, o un metabolita reattivo, non raggiungono il tessuto bersaglio, il test non è idoneo.

Vedi anche Introduzione generale parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Aberrazione cromatica: danno strutturale dei cromosomi che si manifesta nella rottura di un singolo cromatide o nella rottura e ricongiunzione di cromatidi.

Aberrazione cromosomica: alterazione cromosomica strutturale, che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatidi in uno stesso punto.

Endoriduplicazione: processo nel quale, dopo una fase S di replicazione del DNA, il nucleo non inizia la mitosi ma inizia una nuova fase S. Ne risultano cromosomi con 4, 8, 16, . . . cromatidi.

Salto (gap): lesione acromatica, di ampiezza inferiore a un cromatide, con minimo disallineamento dei cromatidi.

Coefficiente mitotico: numero delle cellule in metafase diviso per il numero totale di cellule della popolazione; costituisce un'indicazione del grado di proliferazione della popolazione cellulare.

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caratteristico della specie.

Poliploidia: numero di cromosomi multiplo superiore a due del numero aploide (cioè $3n$, $4n$ ecc.).

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase, che si presenta con perdita di segmenti, riordinamenti intercromosomici e intracromosomici.

1.3 PRINCIPIO METODOLOGICO

Gli animali sono esposti alle sostanze in esame per una via adeguata e vengono quindi sacrificati a tempo debito, dopo somministrazione di un inibitore della metafase (p.es. colchicina o Colcemid®). Sono poi approntate e sottoposte a un processo di colorazione le preparazioni cromosomiche delle cellule di midollo osseo, e se ne analizzano le cellule in metafase per determinare le aberrazioni cromosomiche.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 Preparazioni

1.4.1.1 *Scelta delle specie animali*

Ratti, topi e criceti cinesi sono gli animali più comunemente usati, ma si può usare qualsiasi specie adeguata di mammifero. Si scelgano individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. 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.

1.4.1.2 *Condizioni di stabulazione e alimentazione*

Valgono le condizioni generali citate nell'Introduzione generale alla parte B; l'umidità ideale è pari al 50-60%.

1.4.1.3 *Preparazione degli animali*

Gli animali adulti, sani e giovani sono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere disposte in modo da minimizzare eventuali effetti dovuti alla posizione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni.

1.4.1.4 *Preparazione delle dosi*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è ammissibile.

1.4.2 **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1 *Solvente/mezzo disperdente*

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.

1.4.2.2 *Controlli*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente/mezzo disperdente), trattati in parallelo per ciascun sesso. Gli animali dei gruppi dovranno essere trattati in modo identico, salvo per la somministrazione della sostanza in esame.

I controlli positivi dovrebbero indurre aberrazioni strutturali in vivo a livelli di esposizione ai quali è previsto un aumento rilevabile rispetto alla media. Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. È ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa dalla sostanza in esame ed è sufficiente un solo prelievo per campione. È anche ammissibile l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata, se ne esistono. Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Sostanza	No. CAS	No. EINECS
Metansolfonato di etile	62-50-0	200-536-7
Etilnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamide	50-18-0	200-015-4
Ciclofosfamide monoidrato	6055-19-2	
Trietilenmelamina	51-18-3	200-083-5

In ogni fase del campionamento si proceda a controlli negativi, cui sia somministrato solo il solvente o il mezzo disperdente, senza altre differenze di trattamento, salvo che dati precedenti dimostrino che la variabilità intraspecifica e la frequenza di cellule con aberrazioni cromosomiche sono accettabili. Se per i controlli negativi si procede ad un solo campionamento, il momento più adeguato è quello del primo prelievo. Si ricorra anche a controlli negativi non trattati, salvo che dati precedenti dimostrino che il solvente/mezzo disperdente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

1.5 PROCEDURA

1.5.1 **Numero e sesso degli animali**

Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 5 animali analizzabili per sesso. Se al momento della sperimentazione sono disponibili dati relativi a sperimentazioni sulla stessa specie, con la medesima via di esposizione, che dimostrano che non vi sono sostanziali differenze di tossicità tra i sessi, sarà sufficiente effettuare i test su un solo sesso. Qualora l'esposizione umana alle sostanze chimiche sia specifica per un sesso, come per esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, i test devono essere eseguiti su animali di tale sesso.

1.5.2 **Protocollo di trattamento**

Le sostanze in esame sono somministrate di preferenza in un'unica presa. Possono essere somministrate anche in prese frazionate, per esempio in due prese nello stesso giorno, a distanza di qualche ora al massimo, per agevolare la somministrazione, trattandosi di un prodotto di grande volume. Se si usa una posologia diversa, se ne fornisca la motivazione scientifica.

Dopo il trattamento si proceda al prelievo dei campioni in due momenti diversi dello stesso giorno. Per i roditori il primo prelievo dopo il trattamento è effettuato quando sia trascorso un periodo equivalente ad una volta e mezza la durata del ciclo cellulare (che è di norma di 12-18 ore). Poiché il tempo necessario affinché la sostanza in esame sia assorbita e metabolizzata e produca effetti sulla cinetica del ciclo cellulare può influire sul momento ottimale per l'individuazione delle aberrazioni cromosomiche, si raccomanda di prelevare un altro campione 24 ore dopo. Se il protocollo di trattamento è più lungo di un giorno, si proceda ad un unico campionamento quando sia trascorso un periodo equivalente ad una volta e mezza la durata normale del ciclo cellulare dopo l'ultima somministrazione.

Prima di sacrificare gli animali si inietti per via interperitoneale una dose adeguata di un inibitore della metafase (p.es. Colcemid® o colchicina). Gli animali saranno quindi sacrificati dopo un adeguato lasso di tempo: 3-5 ore circa per i topi, 4-5 ore circa per i criceti cinesi. Si prelevino quindi le necessarie cellule del midollo osseo e si rilevino le aberrazioni cromosomiche.

1.5.3 **Dosi**

Se si procede a uno studio del range, non essendo disponibili dati utili in materia, questo va eseguito nello stesso laboratorio, sulla stessa specie, ceppo e sesso, con il medesimo protocollo usato nel test principale (5). In caso di tossicità si usino per la prima fase di campionamento tre dosi diverse, che vadano dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica. Per il campionamento successivo si usi solo la dose massima. La dose massima è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali. Sostanze con azione biologica specifica, non tossiche a dosi basse (come ormoni e mitogeni) possono costituire eccezione rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. La dose massima può essere definita anche come dose che produce qualche segno di tossicità nel midollo osseo (p.es. una riduzione del coefficiente mitotico superiore al 50%).

1.5.4 **Test con dose limite**

Se la somministrazione di una quantità di sostanza pari ad almeno 2000 mg per kg di peso corporeo in presa unica o in due prese nello stesso giorno non produce effetti tossici rilevabili, e se non vi sono ragioni di sospettare un'azione genotossica sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente correlate, si può considerare che non è necessario procedere alla sperimentazione completa con tre dosi diverse. Per studi di maggiore durata la dose limite è pari a 2000 mg/kg di peso corporeo al giorno, da somministrare per 14 giorni al massimo; è pari a 1000 mg/kg di peso corporeo al giorno per un trattamento più lungo. Se si prevede la possibilità che esseri umani siano esposti alla sostanza in esame, può essere necessario usare una dose più elevata nel test con dose limite.

1.5.5 **Somministrazione**

La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione, oppure mediante iniezione intraperitoneale. Possono essere accettate altre vie se esiste una valida ragione. Il volume massimo di liquido somministrabile in un'unica volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio; non deve superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi più elevati deve essere motivato. Salvo per sostanze irritanti o corrosive, che di norma riveleranno effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, le variazioni di volume devono essere minimizzate, regolando la concentrazione in modo da garantire un volume costante a tutte le dosi.

1.5.6 **Preparazione dei cromosomi**

Non appena l'animale è stato sacrificato, si prelevi il midollo osseo, lo si esponga ad una soluzione ipotonica e lo si fissi. Le cellule siano poi spalmate su vetrini e sottoposte a un processo di colorazione.

1.5.7 **Analisi**

Si determini il coefficiente mitotico come misura della citotossicità in almeno 1000 cellule per animale, in tutti gli animali trattati (compresi i controlli positivi) e nei controlli negativi, non trattati.

Per ogni animale si analizzino almeno 100 cellule. Tale numero può essere ridotto qualora si rilevi un alto numero di aberrazioni. Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio. Poiché le procedure di preparazione dei vetrini causano spesso la rottura di una parte delle cellule in metafase, con perdita di cromosomi, le cellule trattate devono contenere un numero di centromeri pari a $2n \pm 2$.

2. **RISULTATI**

2.1 **TRATTAMENTO DEI RISULTATI**

I dati relativi ai singoli animali vanno presentati in forma di tabelle. L'unità sperimentale è l'animale. Per ciascun animale si indichi il numero di cellule analizzate e si valuti il numero di aberrazioni per cellula e la percentuale di cellule con una o più aberrazioni cromosomiche strutturali. Per i gruppi di trattamento e di controllo si elenchino i vari tipi di aberrazioni cromosomiche strutturali, il loro numero e la loro frequenza. I salti devono essere registrati separatamente e indicati nella relazione, ma non inclusi nella frequenza totale delle aberrazioni. Se non c'è un'evidente differenza di risposta tra i sessi, i dati relativi ai due sessi possono essere combinati nell'analisi statistica.

2.2 **VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento del numero relativo di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche, correlato alla dose somministrata, o un palese aumento del numero di cellule con aberrazioni nei campioni, prelevati alla stessa fase di campionamento e provenienti da un gruppo cui è stata somministrata la stessa dose della sostanza in esame. Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (6), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva. Eventuali risultati ambigui possono essere chiariti mediante test ulteriori, preferibilmente in condizioni di esperimento modificate.

Un aumento del numero di cellule poliploidi può significare che la sostanza in esame è in grado di indurre aberrazioni numeriche nei cromosomi. Un aumento del numero di cellule che presentano endoreduplicazione può significare che la sostanza in esame è in grado di inibire il ciclo cellulare (7)(8).

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio di aberrazione cromosomica in vivo indicano che una sostanza induce aberrazioni cromosomiche nel midollo osseo della specie usata per i test. Risultati negativi indicano che nelle condizioni di test la sostanza in esame non induce aberrazioni cromosomiche nel midollo osseo della specie usata per i test.

Si vagliano le probabilità che la sostanza in esame o i suoi metaboliti raggiungano entrino in circolo o specificamente il tessuto bersaglio (tossicità sistemica).

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente

- motivazione della scelta del mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota;

Animali da laboratorio:

- specie/ceppo usato;
- numero, età e sesso degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;
- peso dei singoli animali all'inizio degli esperimenti, con range, valore medio e deviazione standard per ciascun gruppo;

Condizioni di esperimento:

- controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);
- range, se effettuato;
- criteri di selezione delle dosi;
- illustrazione particolareggiata della preparazione della sostanza in esame;
- illustrazione particolareggiata della somministrazione della sostanza in esame;
- di misura della tossicità;
- criteri di selezione della via di somministrazione;
- metodi usati per verificare che la sostanza in esame sia entrata in circolo o abbia raggiunto il tessuto bersaglio, se del caso;
- conversione della concentrazione (ppm) della sostanza in esame nel cibo o nell'acqua potabile nella dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno), se del caso;
- dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua;
- descrizione dettagliata dei protocolli di trattamento e di campionamento;
- metodi natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata del trattamento;
- metodi di preparazione dei vetrini;
- criteri di conteggio delle aberrazioni;
- numero di cellule analizzate per animale;
- criteri in base ai quali i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

- segni di tossicità;
- coefficiente mitotico;
- tipo e numero delle aberrazioni, indicati separatamente per ciascun animale;
- numero totale delle aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard;
- numero di cellule che presentano aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard;
- eventuali cambiamenti del numero cromosomico;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- eventuali analisi statistiche;
- dati sui controlli negativi paralleli;
- dati sui controlli negativi precedenti, con range, medie e deviazioni standard;
- dati sui controlli positivi paralleli.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

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

B. 12. MUTAGENICITA' – TEST IN VIVO SUI MICRONUCLEI

NEGLI ERITROCITI DI MAMMIFERO

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1 INTRODUZIONE

Il test in vivo sui micronuclei dei mammiferi è usato per individuare i danni indotti dalla sostanza in esame ai cromosomi o all'apparato mitotico degli eritroblasti; si effettua analizzando gli eritrociti provenienti dal midollo osseo e/o dalle cellule del sangue periferico di animali, di norma roditori.

È destinato a identificare sostanze che provocano danni citogenetici, che si manifestano nella formazione di micronuclei contenenti frammenti di cromosomi o cromosomi interi.

Quando da un eritroblasto del midollo osseo si sviluppa un eritrocita policromatico, il nucleo principale viene espulso; i micronuclei formati possono rimanere nel citoplasma che non contiene più il nucleo principale, cosa che rende più agevole la visualizzazione dei micronuclei. L'aumento della frequenza di eritrociti policromatici contenenti micronuclei negli animali trattati è un'indicazione di danno cromosomico indotto.

In questo test si usa solitamente il midollo osseo di roditori: il midollo osseo è il tessuto in cui sono prodotti gli eritrociti policromatici. Il conteggio degli eritrociti immaturi (policromatici) contenenti micronuclei nel sangue periferico è ugualmente accettabile nelle specie in cui è stata provata l'incapacità della milza di svolgere la funzione emocreatrice sugli eritrociti contenenti micronuclei o che sia risultata particolarmente sensibile per l'individuazione di agenti che provocano aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche. Per distinguere i micronuclei si possono usare vari criteri, tra cui la presenza o l'assenza del cinetocore, o centromero, nei micronuclei. L'elemento conclusivo è la frequenza degli eritrociti immaturi (policromatici) contenenti micronuclei. Quando gli animali vengono trattati in continuo per quattro settimane o più, come elemento conclusivo si può usare anche la percentuale di eritrociti maturi (ortocromatici) del sangue periferico che contengono micronuclei.

L'esame dei micronuclei dei mammiferi in vivo è particolarmente idoneo a valutare il rischio mutagenico, in quanto permette di prendere in considerazione elementi del metabolismo, della farmacocinetica e dei processi di riparazione del DNA in vivo, anche se questi possono variare in funzione della specie, dei tessuti e dell'effetto genetico indagato. I test in vivo sono utili anche ad approfondire gli studi di un effetto mutagenico rilevato in vitro.

Qualora risulti che la sostanza in esame, o un suo metabolita reattivo, non raggiungono il tessuto bersaglio, il test non è adeguato.

Vedi anche Introduzione generale, parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Centromero (cinetocoro): Regione/i di un cromosoma sede di attacco del fuso durante la divisione cellulare, che permette il corretto movimento dei cromosomi figli verso i poli delle cellule figlie.

Micronuclei: Piccoli nuclei sovranumerari, separati dal nucleo principale delle cellule, prodotti durante la telofase della mitosi (meiosi) da frammenti residui di cromosomi o da cromosomi interi.

Eritrocita ortocromatico: Eritrocita maturo in cui mancano i ribosomi, che può essere distinto dagli eritrociti policromatici immaturi mediante coloranti selettivi per i ribosomi.

Eritrocita policromatico: Eritrocita immaturo, in uno stadio di sviluppo intermedio, che contiene ancora ribosomi e che pertanto può essere distinto dagli eritrociti ortocromatici maturi mediante coloranti selettivi per i ribosomi.

1.3 PRINCIPIO METODOLOGICO

Gli animali sono esposti alla sostanza in esame tramite una via adeguata. Se si utilizza il midollo osseo, gli animali sono sacrificati a tempo debito dopo il trattamento; il midollo osseo viene quindi prelevato, preparato e colorato (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Se si utilizza sangue periferico, questo viene raccolto a tempo debito dopo il trattamento, si preparano quindi gli strisci e si colorano (4)(8)(9)(10). Per i test eseguiti con sangue periferico l'intervallo fra l'ultima esposizione della sostanza e la raccolta delle cellule dovrebbe essere minimo. Si individuano quindi i micronuclei nei preparati.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 Preparazioni

1.4.1.1 *Scelta delle specie animali*

Se si usa il midollo osseo si raccomanda di servirsi di topi o ratti, benché si possa usare qualsiasi specie adeguata di mammifero. Se si usa il sangue periferico si raccomanda di servirsi di topi, ma si può utilizzare qualsiasi specie adeguata di mammifero, purché sia una specie in cui la milza non espleta la funzione emocateretica sugli eritrociti micronucleati e che si è rivelata sufficientemente sensibile per l'individuazione degli agenti che causano aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche. Si scelgano individui giovani e in buona salute provenienti da ceppi di animali da laboratorio. All'inizio dell'esperimento le variazioni di peso fra gli animali devono essere minime: non possono superare il 20% del peso medio per sesso.

1.4.1.2 *Condizioni di stabulazione e alimentazione*

Valgono le condizioni generali citate nell'Introduzione generale alla parte B; l'umidità ideale è pari al 50-60%.

1.4.1.3 *Preparazione degli animali*

Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere disposte in modo da minimizzare eventuali effetti dovuti alla posizione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni.

1.4.1.4 *Sostanza in esame /Preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è ammissibile.

1.4.2 **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1 *Solvente/ mezzo disperdente*

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.

1.4.2.2 *Controlli*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente/mezzo disperdente), trattati in parallelo per ciascun sesso. Gli animali dei due gruppi dovranno essere trattati in modo identico, salvo per la somministrazione della sostanza in esame.

I controlli positivi dovrebbero produrre micronuclei in vivo a livelli di esposizione che provocano un aumento rilevabile rispetto alla media. Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. È ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa dalla sostanza in esame ed è sufficiente un solo prelievo per campione. È anche ammissibile l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata, se ne esistono. Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Sostanza	No. CAS	No. EINECS
Metansolfonato di etile	62-50-0	200-536-7
N-etil-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Ciclofosfamide	50-18-0	200-015-4
Ciclofosfamide monoidrato	6055-19-2	
Trietilenmelamina	51-18-3	200-083-5

In ogni fase del campionamento si proceda a controlli negativi, cui sia somministrato solo il solvente o il mezzo disperdente, senza altre differenze di trattamento, salvo che dai dati precedenti risulti che la variabilità intraspecifica e la frequenza di cellule con micronuclei sono accettabili. Se per i controlli negativi si procede ad un solo campionamento, lo si effettui al momento del primo prelievo. Si ricorra anche a controlli negativi non trattati, salvo che dati precedenti dimostrino che il solvente/mezzo disperdente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

Se si usa sangue periferico come controllo negativo parallelo è ammissibile anche un campione prelevato prima del trattamento, solo però negli studi brevi sul sangue periferico (che vanno per esempio da 1 a 3 somministrazioni), qualora i dati ottenuti rientrino nel range previsto in letteratura.

1.5 PROCEDURA

1.5.1 Numero e sesso degli animali

Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 5 animali analizzabili per sesso (11). Se al momento della sperimentazione sono disponibili dati relativi a sperimentazioni sulla stessa specie e con la medesima via di esposizione, che dimostrano che non vi sono sostanziali differenze di tossicità tra i sessi, sarà sufficiente effettuare i test su un unico sesso. Qualora l'esposizione umana alle sostanze chimiche sia specifica per un sesso, come per esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, i test devono essere eseguiti su animali di tale sesso.

1.5.2 Protocollo di trattamento

Non si può raccomandare un protocollo standard (cioè 1, 2 o più somministrazioni a intervalli di 24 ore). I campioni ottenuti dopo somministrazione protratta sono accettabili purché sia comprovato un effetto positivo o, per uno studio negativo, ne sia stata dimostrata la tossicità o sia stata usata la dose limite, continuando la somministrazione fino al prelievo dei campioni. La sostanza in esame può essere somministrata anche in prese frazionate, per esempio a due riprese nello stesso giorno, a intervalli non superiori a qualche ora, per agevolarne la somministrazione, trattandosi di un prodotto di grande volume.

Il test può essere eseguito in due modi:

- (a) la sostanza è somministrata agli animali in un'unica presa. Sono prelevati campioni di midollo osseo almeno due volte, ad adeguati intervalli, la prima volta almeno 24 ore dopo il trattamento, l'ultima non dopo 48 ore. Se il prelievo è effettuato meno di 24 ore dopo la somministrazione se ne fornisca la ragione. I campioni di sangue periferico vanno prelevati almeno due volte, ad adeguati intervalli, la prima volta almeno 36 ore dopo la somministrazione, l'ultima non dopo 72 ore. Quando in una delle fasi si abbia una risposta positiva non è necessario procedere ad altri prelievi.
- (b) Se si procede a due o più somministrazioni giornaliere (p.es. due o più somministrazioni ad intervalli di 24 ore), i campioni vanno prelevati un'unica volta, fra le 18 e le 24 ore dopo l'ultima somministrazione per il midollo osseo e tra le 36 e le 48 ore dopo l'ultima somministrazione per il sangue periferico (12).

Se del caso, possono essere effettuati ulteriori campionamenti.

1.5.3 **Dosi**

Se si procede a uno studio del range, non essendo disponibili dati utili in materia, questo va eseguito nello stesso laboratorio, sulla stessa specie, ceppo e sesso, con il medesimo protocollo usato nel test principale (13). In caso di tossicità si usino per la prima fase campionamento tre dosi diverse, che vanno dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica. Per il campionamento successivo si usi solo la dose massima. La dose massima è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali. Sostanze con azione biologica specifica, non tossiche a dosi basse (come ormoni e mitogeni) possono costituire un'eccezione rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. La dose massima può essere definita anche come dose che produce qualche segno di tossicità nel midollo osseo (p.es. una riduzione della percentuale di eritrociti immaturi nel midollo osseo o nel sangue periferico).

1.5.4 **Test con dose limite**

Se la somministrazione di una quantità di sostanza pari ad almeno 2000 mg per kg di peso corporeo in presa unica o in due prese nello stesso giorno non produce effetti tossici rilevabili, e se non vi sono ragioni di sospettare un'azione genotossica sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente correlate, si può considerare che non è necessario procedere alla sperimentazione completa con tre dosi diverse. Per studi di maggiore durata la dose limite è pari a 2000 mg/kg di peso corporeo al giorno, da somministrare per 14 giorni al massimo; per un trattamento più lungo è pari a 1000 mg/kg di peso corporeo al giorno. Se si prevede la possibilità che esseri umani siano esposti alla sostanza in esame, può essere necessario usare una dose più elevata nel test con dose limite.

1.5.5 **Somministrazione**

La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione, oppure mediante iniezione intraperitoneale. Possono essere accettate altre vie se esiste una valida ragione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio; non deve superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi più elevati deve essere motivato. Salvo per sostanze irritanti o corrosive, che di norma riveleranno effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, le variazioni di volume devono essere minimizzate, regolando la concentrazione in modo da garantire un volume costante a tutte le dosi.

1.5.6 **Preparazione di midollo osseo / sangue**

Le cellule del midollo osseo vengono di solito prelevate dal femore o dalla tibia immediatamente dopo che l'animale è stato sacrificato. Le cellule sono prelevate, preparate e sottoposte a un processo di colorazione con metodi di accertata validità. Il sangue periferico è prelevato dalla vena caudale o da altro vaso sanguigno adeguato. Le cellule ematiche vengono immediatamente sottoposte a un processo di colorazione in condizioni sopravvitali (8)(9)(10), oppure si preparano strisci che sono poi colorati. L'uso di un colorante specifico per il DNA (p.es. arancio acridina (14) o Hoechst 33258 più pironina-Y (15)) può eliminare alcuni degli artefatti dovuti all'uso di un colorante non specifico per il DNA. Ciò non esclude l'uso di coloranti convenzionali (p.es. Giemsa). Si possono usare anche altri sistemi (p.es. colonne di cellulosa per la rimozione delle cellule nucleate (16)), se ne è provata l'efficacia per la preparazione dei micronuclei in laboratorio.

1.5.7 **Analisi**

La percentuale degli eritrociti immaturi rispetto al totale (immaturi + maturi) viene determinata per ciascun animale contando in tutto almeno 200 eritrociti per il midollo osseo e 1000 per il sangue periferico (17). Tutti i vetrini, compresi i controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio. Si esaminino almeno 2000 eritrociti immaturi per animale per determinare la frequenza degli eritrociti immaturi micronucleati. Informazioni ulteriori si possono ottenere dal conteggio dei micronuclei negli eritrociti maturi. Nell'analisi dei vetrini, la proporzione degli eritrociti immaturi sugli eritrociti totali non deve essere inferiore al 20% del valore dei controlli. Quando gli animali sono trattati in continuo per 4 settimane o più, può anche determinare la frequenza degli eritrociti con micronuclei su almeno 2000 eritrociti maturi per animale. In alternativa alle tecniche manuali, si possono accettare sistemi di analisi automatica (analisi dell'immagine e citometria a flusso continuo su cellule in sospensione), se adeguatamente motivati e di provata efficacia.

2. **DATI**

2.1 **TRATTAMENTO DEI RISULTATI**

I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. L'unità sperimentale è l'animale. Il numero degli eritrociti immaturi e degli di eritrociti immaturi con micronuclei, nonché la percentuale degli eritrociti immaturi, devono essere elencati separatamente per ciascun animale. Quando gli animali sono trattati in continuo per 4 settimane o più, si forniscano anche i dati relativi agli eritrociti maturi, se sono stati rilevati. Si indichi per ciascun animale la percentuale degli eritrociti immaturi sul totale e, se ritenuta utile, la percentuale degli eritrociti micronucleati. Se non c'è un'evidente differenza di risposta tra i sessi, i dati dei due sessi possono essere combinati nell'analisi statistica.

2.2 **VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento correlato alla dose somministrata del numero di cellule contenenti micronuclei, o un evidente aumento del numero di cellule contenenti micronuclei nei campioni prelevati alla medesima fase di campionamento e provenienti da un gruppo cui è stata somministrata la stessa dose. Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (18)(19), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva. Eventuali risultati ambigui possono essere chiariti mediante test ulteriori, preferibilmente in condizioni di esperimento modificate.

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio significano che la sostanza induce la formazione di micronuclei, che sono il risultato di un danno cromosomico o di un danno all'apparato mitotico negli eritroblasti della specie in esame. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni di esperimento, la sostanza in esame non produce micronuclei negli eritrociti immaturi della specie in esame.

Si vagli la possibilità che la sostanza in esame o i suoi metaboliti entrino in circolo o raggiungano specificamente il tessuto bersaglio (tossicità sistemica).

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione deve comprendere le seguenti informazioni:

Solvente/Mezzo disperdente

- motivazione della scelta del mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;

Animali da laboratorio:

- specie/ceppo usato;
- numero, età e sesso degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;
- peso dei singoli animali all'inizio degli esperimenti, con range, valore medio e deviazione standard per ciascun gruppo;

Condizioni di esperimento:

- controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);
- range, se effettuato;
- criteri di selezione delle dosi
- illustrazione particolareggiata della preparazione della sostanza in esame;
- illustrazione particolareggiata della somministrazione della sostanza in esame;
- metodi usati per verificare che la sostanza in esame sia entrata in circolo o abbia raggiunto il tessuto bersaglio, se del caso;
- criteri di selezione della via di somministrazione;
- conversione della concentrazione (ppm) della sostanza in esame nella nel cibo o nell'acqua potabile nella dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno), se del caso;
- dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua;
- descrizione dettagliata dei protocolli di trattamento e campionamento;
- metodi di preparazione dei vetrini;
- metodi di misura della tossicità;
- criteri di conteggio degli eritrociti immaturi contenenti micronuclei;
- numero di cellule analizzate per animale;
- criteri in base a cui i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

- segni di tossicità;
- proporzione degli eritrociti immaturi sugli eritrociti totali;
- numero di eritrociti immaturi contenenti micronuclei per animale;
- media \pm deviazione standard degli eritrociti immaturi contenenti micronuclei per gruppo;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- analisi statistiche e metodi applicati;
- controlli negativi paralleli e in letteratura;
- controlli positivi paralleli.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

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

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

B. 13/14. MUTAGENICITA': TEST DI RETROMUTAZIONE SU BATTERI

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 INTRODUZIONE

Il saggio di retromutazione su batteri utilizza ceppi di *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* auxotrofi nei confronti di un amminoacido per identificare mutazioni puntiformi che implicano sostituzione, addizione o delezione di una o più paia di basi del DNA (1)(2)(3). Il principio su cui è basato questo saggio è la sua capacità di rivelare nei ceppi sperimentali retromutazioni che ripristinano la capacità funzionale dei batteri di sintetizzare un amminoacido essenziale. I batteri retromutanti sono individuati in base alla capacità di crescere in assenza dell'amminoacido di cui ha invece bisogno il ceppo sperimentale progenitore.

Le mutazioni puntiformi sono causa di molte malattie genetiche umane e vi sono prove concrete che mutazioni puntiformi in oncogeni e geni soppressori dei tumori di cellule somatiche sono implicate nella comparsa delle neoplasie umane come in quelle sperimentalmente indotte negli animali da laboratorio. Il saggio di retromutazione batterica è rapido, poco costoso e relativamente facile da eseguire. Molti ceppi sperimentali presentano caratteristiche che li rendono più sensibili per l'identificazione di mutazioni, in particolare sequenze di DNA sensibili nei siti di reversione, maggior permeabilità cellulare per le grandi molecole e assenza dei sistemi di riparazione del DNA, o rafforzamento dei sistemi soggetti a errore. La specificità dei ceppi sperimentali può fornire informazioni utili sul tipo di mutazioni indotte da agenti genotossici. Per i test di retromutazione batterica esiste una vastissima base dati, che contiene i risultati per una grande varietà di strutture e sono stati sviluppati metodi ormai classici per l'analisi chimica di prodotti con proprietà chimico-fisiche diverse, compresi i composti volatili.

Vedi anche Introduzione generale parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Un test di retromutazione in *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* rivela in un ceppo auxotrofo, che necessita l'apporto di un amminoacido (rispettivamente istidina o triptofano) una mutazione che lo trasforma in un ceppo che non necessita l'apporto dell'amminoacido.

Mutageni che provocano la sostituzione di coppie di basi sono agenti che provocano un cambiamento di basi nel DNA. In un test di reversione questo cambiamento può verificarsi nel sito della mutazione originale o in un altro sito del genoma batterico.

Mutageni che provocano la mutazione della fase di lettura sono agenti che provocano l'inserzione o la delezione di una o più basi nel DNA, modificando così la fase di lettura nell'RNA.

1.3 CONSIDERAZIONI INIZIALI

Nel saggio di retromutazione batterica si usano cellule procariote, che differiscono dalle cellule dei mammiferi in fattori come l'assorbimento, il metabolismo, la struttura cromosomica e i meccanismi di riparazione del DNA. I test in vitro richiedono in genere una fonte esogena di attivazione metabolica. I sistemi di attivazione metabolica in vitro non sono in grado di simulare perfettamente le condizioni in vivo nei mammiferi. Il test pertanto non fornisce informazioni dirette sul potenziale mutageno e cancerogeno di una sostanza nei mammiferi.

Il saggio di retromutazione batterica è comunemente impiegato come prima tappa per individuare l'azione genotossica e in particolare la capacità di indurre mutazioni puntiformi. Numerosi dati dimostrano che molte sostanze chimiche che risultano positive a questo saggio presentano attività mutagena anche in altri test. Vi sono esempi di agenti mutageni che non sono rivelati da questo test; le ragioni di questi insuccessi possono essere ricondotte alla natura specifica della mutazione, a differenze di attivazione metabolica o a differenze di biodisponibilità. D'altra parte i fattori che aumentano la sensibilità del test possono indurre a sopravvalutare l'azione mutagena.

Il test di retromutazione batterica può non essere adatto per la valutazione di alcune classi di sostanze chimiche, per esempio i composti fortemente battericidi (come alcuni antibiotici) e quelli di cui si suppone (o si sa) che interferiscano specificamente con il sistema di moltiplicazione cellulare nei mammiferi (p.es. alcuni inibitori delle topoisomerasi e alcuni analoghi di nucleosidi). In tali casi possono essere più adeguati test su mammiferi.

Molti composti che risultano positivi al test sono cancerogeni nei mammiferi, tuttavia la correlazione non è assoluta: dipende dalla classe chimica. Inoltre vi sono cancerogeni che non sono rivelati da questo saggio, perché agiscono con meccanismi diversi, non genotossici, o con meccanismi assenti nelle cellule batteriche.

1.4 PRINCIPIO METODOLOGICO

Le cellule batteriche in sospensione sono esposte alla sostanza in esame in presenza e in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica. Nel metodo di incorporazione su piastra tali sospensioni sono miscelate con un agar di copertura e piastrate immediatamente su terreno minimo. Nel metodo di preincubazione il composto di trattamento è posto in incubazione, mescolato ad un agar di copertura, poi piastrato su terreno minimo. In entrambe le tecniche dopo due o tre giorni di incubazione si contano le colonie revertanti e se ne confronta il numero con quello delle colonie revertanti spontanee su piastre di controllo esposte al solo solvente.

Per i test di retromutazione batterica sono state descritte varie procedure. Quelle più comunemente usate sono: il metodo di incorporazione su piastra (1)(2)(3)(4), il metodo di preincubazione (2)(3)(5)(6)(7)(8), il metodo di fluttuazione (9)(10), e il metodo di sospensione (11). Sono state descritte modifiche per i test su gas o vapori (12).

Le procedure descritte riguardano principalmente i metodi di incorporazione su piastra e di preincubazione. Sono entrambi ammissibili per l'esecuzione di esperimenti con e senza attivazione metabolica. Per alcune sostanze è più efficace il metodo di preincubazione. Si tratta di sostanze appartenenti alle classi chimiche che includono le nitrosammine alifatiche a catena corta, i metalli bivalenti, le aldeidi, i coloranti azoici e i composti diazoici, gli alcaloidi pirrolizidinici, i composti allilici e i nitrocomposti (3). È noto anche che alcune classi di mutageni non sono sempre identificabili con procedure standard come il metodo di incorporazione su piastra o il metodo di preincubazione. Devono essere considerate "casi speciali" e si raccomanda vivamente di usare altri metodi di rilevazione. Sono stati identificati i seguenti "casi speciali" (con esempi di possibili metodi di rilevazione): coloranti azoici e composti diazoici (3)(5)(6)(13), gas e sostanze chimiche volatili (12)(14)(15)(16) e glicosidi (17)(18). Le deviazioni dalla procedura standard devono essere scientificamente motivate.

1.5 DESCRIZIONE DEL METODO

1.5.1 Preparazioni

1.5.1.1 Batteri

Si lasciano sviluppare le colture fresche di batteri fino alla fase esponenziale tardiva o alla fase stazionaria precoce (approssimativamente 10^9 cellule per ml). Non si usino colture in fase stazionaria tardiva. È essenziale che le colture usate nell'esperimento contengano un titolo elevato di batteri vitali. Il titolo può essere provato sulla base di dati di controllo precedenti sulle curve di crescita, oppure, nei singoli saggi, determinando il numero di cellule vitali mediante un test di piastramento.

La temperatura di incubazione raccomandata è di 37°C.

Si usino almeno cinque ceppi di batteri, tra cui quattro ceppi di *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 o TA97a o TA97; TA98; e TA100) la cui affidabilità è provata e che forniscono risposte riproducibili. I ceppi di *S. typhimurium* contengono paia di basi GC sul sito di reversione primario ed è noto che non permettono di identificare alcuni mutageni ossidanti, agenti che provocano cross-linking (legami forti fra i due filamenti del DNA) e idrazine. Tali sostanze possono essere individuate con ceppi di *E. coli* WP2 o da *S. typhimurium* TA102 (19) che hanno una coppia di basi AT sul sito di reversione primaria. La combinazione di ceppi raccomandata è pertanto:

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

Al fine di rilevare mutageni che provocano cross-linking, può essere preferibile includere TA102 o aggiungere un ceppo di *E. coli* con sistema di riparazione del DNA privo di errore [p.es. *E. coli* WP2 o *E. coli* WP2 (pKM101)]

Si usino metodi di provata validità per la preparazione delle colture primarie, la verifica dei marcatori e la conservazione. La necessità dell'amminoacido in supplemento nutritivo per la crescita deve essere dimostrata per ciascuna delle colture congelate (istidina per ceppi di *S. typhimurium*, e triptofano per ceppi di *E. coli*). Si controllino anche altre caratteristiche fenotipiche, e cioè: la presenza o l'assenza di plasmidi R [resistenza all'ampicillina nei ceppi TA98, TA100 e TA97a o TA97, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101), e resistenza a ampicillina + tetraciclina nel ceppo TA102], se del caso; la presenza di mutazioni caratteristiche (cioè la mutazione rfa in *S. typhimurium* attraverso la sensibilità al cristalvioletto e la mutazione uvrA in *E. coli* o la mutazione uvrB in *S. typhimurium*, attraverso la sensibilità all'ultravioletto) (2)(3). I ceppi devono produrre un certo numero di colonie retromutanti spontanee per piastra, situato entro il range di frequenze rapportato ai valori precedenti ottenuti nel laboratorio e, possibilmente, ai valori del range in letteratura.

1.5.1.2 Terreno di coltura

Si usi una minima quantità di agar adeguato (p.es. contenente una minima quantità di terreno E di Vogel-Bonner e glucosio) e un agar di copertura contenente istidina e biotina o triptofano tale da permettere un certo numero di divisioni cellulari (1)(2)(9).

1.5.1.3 Attivazione metabolica

I batteri dovrebbero essere esposti alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un adeguato sistema di attivazione metabolica. Il sistema più comunemente usato è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), prelevata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici come: Aroclor 1254 (1)(2), o una combinazione di fenobarbitone e β -naftoflavone (18)(20)(21). La frazione post-mitocondriale viene usata di solito a concentrazioni comprese fra 5 e 30% v/v nel composto S9. La scelta e le condizioni di un sistema di attivazione metabolica dipendono dalla classe chimica della sostanza in esame. In alcuni casi può essere opportuno utilizzare più di una concentrazione della frazione post-mitocondriale. Per coloranti azoici e composti diazoici, può essere più adeguato un sistema di attivazione metabolica riduttivo (6)(13).

1.5.1.4 Sostanza in esame /Preparazione

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento dei batteri. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità, che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Il solvente/mezzo disperdente non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame e deve essere compatibile con la sopravvivenza dei batteri e con l'attività di S9 (22). 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. Se si procede all'esame di sostanze instabili in acqua, si usino solventi organici anidri.

1.5.2 Condizioni di esperimento

1.5.2.1 Ceppi sottoposti a test (vedi 1.5.1.1)

1.5.2.2 Concentrazione di esposizione

I criteri da considerare per determinare la quantità massima di sostanza da usare sono la citotossicità e la solubilità nel composto di trattamento finale.

Può essere utile determinare la tossicità e l'insolubilità in un esperimento preliminare. La citotossicità può essere rivelata da una riduzione del numero di colonie revertanti, dalla comparsa di una placca anormale del fondo, o dal grado di sopravvivenza delle colture trattate. La citotossicità di una sostanza può risultare alterata in presenza di sistemi di attivazione metabolica. L'insolubilità è dimostrata dalla presenza di un precipitato nel composto finale, visibile ad occhio nudo nelle condizioni di esperimento effettive.

La concentrazione massima raccomandata per sostanze non citotossiche solubili è di 5 mg/piastra o 5 µl/piastra. Per sostanze non citotossiche insolubili a 5 mg/piastra o 5 µl/piastra, una o più concentrazioni devono essere insolubili nelle ultime miscele di trattamento. Le sostanze citotossiche a concentrazioni inferiori a 5 mg/piastra o 5 µl/piastra devono essere saggiate fino ad una concentrazione citotossica. Il precipitato non deve interferire con la valutazione dei risultati.

Si usino almeno cinque diverse concentrazioni analizzabili della sostanza in esame, ad intervalli approssimativamente semilogaritmici (cioè $\sqrt{10}$) per i primi esperimenti. Per l'analisi della relazione concentrazione-risposta, può essere necessario ridurre gli intervalli. Nella valutazione di sostanze che contengono quantità sostanziali di impurezze potenzialmente mutagene si possono prendere in considerazione concentrazioni superiori a 5 mg/piastra o 5 µl/piastra.

1.5.2.3 Controlli negativi e positivi

Ogni test dovrà comportare controlli positivi e negativi (solvente o mezzo disperdente) paralleli, con e senza attivazione metabolica. Per i controlli positivi, si scelgano concentrazioni che dimostrino la validità di ogni test.

Quando si usa un sistema di attivazione metabolica, le sostanze per i controlli positivi di riferimento devono essere scelte in funzione del tipo di ceppo batterico.

Le seguenti sostanze sono esempi di controlli positivi adatti per saggi con attivazione metabolica:

Numero CA	Numero EINECS	Denominazione
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantracene
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenz[a]antracene
50-32-8	200-028-5	benzo[a]pirene
613-13-8	210-330-9	2-amminoantracene
50-18-0	200-015-4	ciclofosfamide
6055-19-2		ciclofosfamide monoidrato

La seguente sostanza è un controllo positivo adatto per il metodo di attivazione metabolica riduttiva:

573-58-0	209-358-4	Congo Red
----------	-----------	-----------

Il 2-amminoantracene non dovrebbe essere usato come unico indicatore dell'efficacia del composto S9. Se si usa il 2-amminoantracene, si caratterizzi ogni lotto di S9 anche con un mutageno che richiede attivazione metabolica da parte di enzimi microsomiali, per esempio benzo[a]pirene, dimetilbenzantracene.

Le seguenti sostanze sono esempi di controlli positivi a specificità di ceppo per esperimenti eseguiti senza sistema di attivazione metabolica esogeno:

Numero CAS	Numero EINECS	Denominazione	Ceppo
26628-22-8	247-852-1	sodio azide	TA 1535 e TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluorene	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-amminoacridina	TA 1537, TA 97 e TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 e TA 97a
80-15-9	201-254-7	idroperossido di cumene	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicina C	WP2 uvrA e TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	WP2, WP2uvrA e WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrochinolina-1-ossido	WP2, WP2uvrA e WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furilfurammide (AF2)	ceppi contenenti plasmidi

Si possono usare altre adeguate sostanze di riferimento per i controlli positivi. Si usino, se disponibili, sostanze di una classe chimica correlata.

Si effettuino anche controlli negativi, usando solo il solvente o il mezzo disperdente sul terreno di coltura; i controlli vanno trattati come le colture che contengono la sostanza oggetto del test. Si proceda inoltre a controlli non trattati, salvo che esistano precedenti dati di controllo che dimostrano che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

1.5.3 **Procedura**

Per il metodo di incorporazione su piastra (1)(2)(3)(4), senza attivazione metabolica di norma si mescolano 0,05 ml o 0,1 ml della soluzione, 0,1 ml di coltura batterica fresca (contenente approssimativamente 10^8 cellule vitali) e 0,5 ml di tampone sterile con 2,0 ml di agar di copertura. Per i test con attivazione metabolica si mescolano di norma 0,5 ml del composto di attivazione metabolica contenente una quantità adeguata di frazione post-mitochondriale (dal 5 al 30% v/v) con l'agar di copertura (2,0 ml), i batteri e la sostanza in esame o la soluzione. Il contenuto di ciascuna provetta viene mescolato e piastrato su terreno minimo (agar). Prima dell'incubazione si lascia solidificare l'agar di copertura.

Per il metodo di preincubazione (2)(3)(5)(6), la sostanza in esame/ soluzione è preincubata con il ceppo batterico (contenente approssimativamente 10^8 cellule vitali) e con un tampone sterile o con il sistema di attivazione metabolica (0,5 ml), di norma per 20 minuti o più, a 30-37°C; è quindi mescolata all'agar di copertura e piastrata su terreno minimo (agar). Di norma si mescolano 0,05 o 0,1 ml di sostanza in esame/soluzione, 0,1 ml di batteri e 0,5 ml di composto S9 o di tampone sterile con 2,0 ml di agar di copertura. Durante la preincubazione le provette vanno aerate con un agitatore.

Per una valida stima della variazione, si usino piastre in triplo a ciascuna dose. L'uso di piastre in doppio è accettabile se scientificamente motivato. La perdita occasionale di una piastra non invalida necessariamente il test.

I test con sostanze gassose o volatili devono essere condotti con metodi adeguati, per esempio in recipienti ermetici (12)(14)(15)(16).

1.5.4 **Incubazione**

Tutte le piastre di un esperimento devono essere poste in incubazione a 37°C per 48-72 ore; si rilevi quindi il numero di colonie revertanti per piastra.

2. **RISULTATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati devono essere presentati come numero di colonie revertanti per piastra. Si fornisca anche il numero di colonie revertanti sulle piastre dei controlli negativi (controllo trattato con solo solvente e controllo non trattato, se effettuato) e positivi. Per la sostanza in esame e per i controlli, positivi e negativi (non trattati o con solo solvente) si indichino le cifre per le singole piastre, il numero medio di colonie revertanti per piastra e la deviazione standard.

In caso di risposta inequivocabilmente positiva non sono necessarie verifiche. I risultati ambigui devono essere chiariti mediante prove ulteriori, preferibilmente in condizioni di esperimento modificate. I risultati negativi devono essere confermati caso per caso. Se non si ritiene necessaria la conferma dei risultati negativi, se ne indichino le ragioni. Nei test successivi si dovrebbero modificare i parametri di studio per estendere la gamma delle condizioni in esame. Fra i parametri modificabili si citano l'intervallo tra le concentrazioni, il metodo di trattamento (incorporazione su piastra o preincubazione in ambiente liquido) e le condizioni di attivazione metabolica.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento, correlato con la concentrazione, per tutte le concentrazioni sottoposte a esame e/o un aumento riproducibile, ad una o più concentrazioni, del numero di colonie revertanti per piastra per almeno un ceppo, con o senza sistema di attivazione metabolica (23). Si consideri in primo luogo la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (24), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva.

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati palesemente positivi o negativi, ma in alcuni casi i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio di retromutazione batterica dimostrano che la sostanza induce mutazioni puntiformi per sostituzioni di basi o mutazione della fase di lettura nel genoma di *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni di test, la sostanza in esame non induce mutazioni nella specie sottoposta al test.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/Mezzo disperdente

- motivazione della scelta del solvente/mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota;

Ceppi:

- ceppi usati;
- numero per cellule per coltura;
- caratteristiche dei ceppi;

Condizioni di esperimento:

- quantità della sostanza in esame per piastra (mg/piastra o µl/piastra) e criteri di selezione della concentrazione e del numero di piastre per concentrazione;
- terreni usati;
- tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica, criteri di accettabilità;
- procedura di trattamento.

Risultati:

- segni di tossicità;
- segni di precipitazione;
- conteggi per le singole piastre;
- numero medio di colonie revertanti per piastra e deviazione standard;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- eventuali analisi statistiche;
- dati sui controlli paralleli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi, con ranges, medie e deviazioni standard;
- dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi precedenti, con ranges, medie e deviazioni standard;

Illustrazione.

Conclusioni.

BIBLIOGRAFIA

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

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

B. 15

MUTAZIONE GENICA: SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Per misurare l'induzione di mutazioni geniche indotte da agenti chimici, con e senza attivazione metabolica, può essere fatto uso di una varietà di ceppi aploidi e diploidi del lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Sono stati utilizzati sistemi di mutazione in avanti in ceppi aploidi, come la misura della mutazione da mutanti rossi, richiedenti adenina (*ade-1*, *ade-2*), a doppi mutanti bianchi richiedenti adenina; e sistemi selettivi come l'induzione della resistenza alla canavanina.

Il sistema di retromutazione più largamente convalidato comporta l'uso del ceppo aploide XV 185-14C che porta le mutazioni di tipo «senza senso» (*ochre*) *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* e *trp 5-48*, le quali possono essere revertite da mutageni che inducono sostituzioni di base nel sito specifico o mutazioni che sopprimono «ochre». Il ceppo XV 185-14C porta altresì il marcatore *his 1 - 7*, mutazione di tipo «senso sbagliato» revertita principalmente da mutazioni nel secondo sito, e il marcatore *hom 3 - 10* che viene revertito da mutageni che inducono mutazioni del tipo «inserzione-delezione».

Fra i ceppi diploidi del *S. cerevisiae* il solo largamente convalidato è il ceppo D₇, omozigote per *ilv 1-92*.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparati

È opportuno preparare le soluzioni delle sostanze in esame e dei composti di controllo o di riferimento, servendosi di un veicolo appropriato, al momento dell'effettuazione del test. Con i composti organici non solubili in acqua si devono usare soluzioni di solventi organici quali l'etanolo, l'acetone e il dimetilsolfossido (DMSO) a non più del 2 % in volume (v/v). La concentrazione finale del solvente non dovrebbe influenzare in modo significativo la vitalità cellulare e le caratteristiche di crescita.

Attivazione metabolica

Le cellule vanno esposte alle sostanze in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica esogena.

Il sistema più comunemente usato è una frazione postmitocondriale integrata con cofattori, ottenuta dai fegati di roditori pretrattati con agenti che inducono enzimi. Per l'attivazione metabolica può essere appropriato anche l'uso di altre specie, di altri tessuti, di altre frazioni postmitocondriali o di altri procedimenti.

Condizioni di effettuazione del saggio

Ceppi

I ceppi più largamente usati negli studi sulle mutazioni geniche sono il ceppo aploide XV 185-14C e il ceppo diploide D₇. Possono essere appropriati anche altri ceppi.

Terreni di coltura

Per la determinazione della sopravvivenza delle cellule e del numero dei mutanti è fatto uso di terreni di coltura appropriati.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno procedere in parallelo a controlli positivi, non trattati e con il solo solvente. Per ciascun evento genetico specifico vanno usate appropriate sostanze di controllo positivo.

Concentrazioni

Occorre far uso di almeno 5 concentrazioni adeguatamente intervallate della sostanza in esame. Per le sostanze tossiche la concentrazione più elevata usata nel test non deve ridurre la sopravvivenza a meno del 5-10%. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche completamente solubili in acqua la concentrazione massima va determinata caso per caso.

Condizioni di incubazione

Le piastre vengono incubate per 4-7 giorni a temperatura da 28° a 30 °C nell'oscurità.

Frequenze delle mutazioni spontanee

È opportuno usare subcolture con frequenze delle mutazioni spontanee entro i limiti accettati come normali.

Numero delle repliche

Per la determinazione dei prototrofi che si inducono per mutazione genica e della sopravvivenza cellulare è opportuno fare uso di almeno tre piastre di replica per concentrazione. Nel caso di esperimenti nei quali si usino marcatori a bassa frequenza di mutazione, quali *hom* 3-10, per poter ottenere dati aventi rilevanza statistica è necessario aumentare il numero delle piastre.

Procedimento

Il trattamento dei ceppi di *S. cerevisiae* viene normalmente effettuato secondo un procedimento di test in sospensione liquida con impiego di cellule quiescenti o in crescita. Gli esperimenti iniziali dovrebbero essere condotti su cellule in crescita. Si espongono alla sostanza in esame per una durata fino a 18 ore a temperatura da 28° a 37 °C e in agitazione $1-5 \times 10^7$ cellule/ml; in casi opportuni, nel corso del trattamento si aggiunge una quantità adeguata di un sistema di attivazione metabolica. Al termine del trattamento si procede alla centrifugazione ed al lavaggio delle cellule ed alla loro semina su un terreno di coltura appropriato. Dopo incubazione si analizzano le piastre per la determinazione della sopravvivenza e dell'induzione della mutazione genica.

Se il primo esperimento è negativo il secondo esperimento dovrebbe essere condotto su cellule quiescenti; se il primo esperimento è positivo, viene confermato in un appropriato esperimento indipendente.

2.

DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle, con indicazione del numero delle colonie contate, del numero di mutanti, della sopravvivenza e della frequenza dei mutanti. Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente. I dati devono essere stabiliti secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- ceppo usato,
- condizioni di effettuazione del test: cellule in fase stazionaria o in crescita, composizione dei terreni, temperatura e durata dell'incubazione, sistemi di attivazione metabolica,
- condizioni del trattamento: livelli di esposizione, procedimento e durata del trattamento, temperatura di trattamento, controlli positivi e negativi,
- numero delle colonie contate, numero di mutanti, sopravvivenza e frequenza dei mutanti, relazione dose/risposta se disponibile, valutazione statistica dei dati,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 16

RICOMBINAZIONE MITOTICA: SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La ricombinazione mitotica in *Saccharomyces cerevisiae* può essere rilevata fra geni (o in linea più generale fra un gene e il suo centromero) e all'interno dei geni. La prima delle due eventualità è denominata crossing-over mitotico e genera prodotti reciproci, mentre la seconda eventualità è per lo più non reciproca ed è denominata conversione genica. Il crossing-over viene generalmente determinato mediante la produzione di colonie o settori recessivi omozigoti in un ceppo eterozigote, mentre la conversione genica viene determinata attraverso la produzione di revertanti prototrofici in un ceppo auxotrofico eteroalleomorfo portante due diversi alleli del medesimo gene. I ceppi più comunemente usati per la rilevazione della conversione genica mitotica sono i ceppi D_4 (eteroalleomorfo in *ade 2* e *trp 5*), D_7 (eteroalleomorfo in *trp 5*), $BZ_{3,4}$ (eteroalleomorfo in *arg 4*) e $JD1$ (eteroalleomorfo in *his 4* e *trp 5*). Il crossing-over mitotico produce settori omozigoti di colore rosso e rosa può essere determinato nel ceppo D_5 o in D_7 (che misura anche la conversione genica mitotica e la retromutazione in *ilv 1-92*), essendo entrambi i ceppi eteroalleomorfi per alleli complementanti di *ade 2*.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

È opportuno preparare le soluzioni della sostanza in esame e dei composti di controllo o di riferimento, facendo uso di un solvente appropriato, al momento di procedere all'effettuazione del test. Con i composti organici non solubili in acqua è opportuno usare solventi organici come l'etanolo, l'acetone e il dimetilsolfossido (DMSO) a non più del 2% (v/v). La concentrazione finale del solvente non dovrebbe alterare significativamente la vitalità cellulare e le caratteristiche di crescita.

Attivazione metabolica

Le cellule devono essere esposte alle sostanze in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica esogena. Il sistema più comunemente usato è una frazione postmitocondriale supplementare con cofattori e ottenuta dai fegati di roditori pretrattati con agenti che inducono enzimi. Per l'attivazione metabolica può essere appropriato anche l'impiego di altre specie, di altri tessuti, di altre frazioni postmitocondriali o di altri procedimenti.

Condizioni sperimentali

Ceppi

I ceppi più frequentemente usati sono i ceppi diploidi D_4 , D_5 , D_7 , e $JD1$. Può essere appropriato anche l'impiego di altri ceppi.

Terreni di coltura

Per la determinazione della sopravvivenza e della frequenza della ricombinazione mitotica si devono usare terreni di coltura appropriati.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno effettuare in parallelo controlli positivi, controlli non trattati o trattati con solo solvente. Per ciascun tipo specifico di ricombinazione devono essere usate le appropriate sostanze di controllo positivo.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di almeno cinque concentrazioni della sostanza in esame adeguatamente intervallate. Tra i fattori da prendere in considerazione vi sono la citotossicità e la solubilità. La concentrazione più bassa non deve produrre alcun effetto sulla vitalità cellulare. Per le sostanze tossiche, la più alta concentrazione saggiata non deve ridurre la sopravvivenza a meno del 5-10%. Le sostanze relativamente insolubili in acqua devono essere saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima del test va determinata caso per caso.

Le cellule possono essere esposte alle sostanze in esame in fase stazionaria o in fase di crescita per periodi fino a 18 ore. Nel caso di tempi di trattamento prolungati occorre tuttavia accertare mediante esame microscopico che nelle culture non vi sia formazione di spore, la cui presenza invaliderebbe il test.

Condizioni di incubazione

Le piastre vengono incubate nell'oscurità per 4-7 giorni a temperatura da 28 ° a 30 °C. Le piastre usate per l'analisi dei settori omozigoti di colore rosso e roseo derivanti dal crossing-over mitotico vanno tuttavia tenute in frigorifero (4 °C) per un altro ciclo di uno o due giorni prima dell'analisi, per dare tempo allo sviluppo del pigmento nelle colonie ricombinanti.

Frequenze della ricombinazione mitotica spontanea

È opportuno usare subcolture con frequenze di ricombinazione mitotica spontanea entro i limiti accettati come normali.

Numero delle repliche

Per la determinazione dei prototrofi prodotti dalla conversione genica mitotica e per quella della sopravvivenza è opportuno fare uso di un minimo di tre piastre di replica per concentrazione. Nella determinazione della omozigosi recessiva derivante dal crossing-over mitotico il numero delle piastre va aumentato in modo da ottenere un numero adeguato di colonie.

Procedimento

Il trattamento dei ceppi di *S. cerevisiae* viene normalmente effettuato in un procedimento di test in sospensione liquida con cellule in fase stazionaria o in fase di crescita. Esperimenti iniziali dovrebbero essere condotti su cellule in fase di crescita. Si espongono alla sostanza in esame per una durata fino a 18 ore a temperatura da 28 ° a 37 °C con scuotimento $1 - 5 \times 10^7$ cellule/ml; nel corso del trattamento, nei casi opportuni si aggiunge una quantità adeguata di un sistema di attivazione metabolica. Al termine del trattamento si procede alla centrifugazione ed al lavaggio delle cellule ed alla loro semina su un terreno di coltura appropriato. Dopo l'incubazione si analizzano le piastre per la determinazione della sopravvivenza e dell'induzione della ricombinazione mitotica.

Se il primo esperimento è negativo il secondo dovrebbe essere eseguito su cellule quiescenti; se il primo esperimento è positivo, il secondo viene confermato in un esperimento indipendente appropriato.

2.

DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle, con indicazione del numero dei ricombinanti, della sopravvivenza e della frequenza dei ricombinanti.

Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente. I dati vanno stabiliti per valutazione secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- ceppo usato,
- condizioni di effettuazione del test: cellule in fase stazionaria o di crescita, composizione dei terreni, temperatura e durata dell'incubazione, sistemi di attivazione metabolica,
- condizioni del trattamento: concentrazione di esposizione, procedimento e durata del trattamento, temperatura di trattamento, controlli positivi e negativi,
- numero di colonie contate, numero dei ricombinanti, frequenza della sopravvivenza e della ricombinazione, relazione dose/risposta se possibile, valutazione statistica dei dati,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 17. MUTAGENICITA' – TEST IN VITRO DI MUTAZIONE GENICA

SU CELLULE DI MAMMIFERO

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 476, In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1 INTRODUZIONE

Il test in vitro di mutazione genica su cellule di mammifero permette di identificare mutazioni geniche indotte da sostanze chimiche. Fra le linee cellulari adeguate si citano le cellule di linfoma di topo L5178Y, le linee CHO, CHO-AS52 e V79 di cellule di criceto cinese, le cellule linfoblastoidi umane TK6 (1). In queste linee cellulari di norma si misurano le mutazioni sui loci della timidina chinasi (TK) e dell'ipoxantina-guanina fosforibosil trasferasi (HPRT) e su un transgene della xantina-guanina fosforibosil trasferasi (XPRT). I saggi di mutazione TK, HPRT e XPRT rivelano varie categorie di fenomeni genetici. La posizione autosomica di TK e XPRT può permettere di individuare effetti genetici (p.es. grandi delezioni) non individuati sul locus HPRT dei cromosomi X (2)(3)(4)(5)(6).

Nel test in vitro di mutazione genica su cellule di mammifero si possono usare colture di linee cellulari stabilizzate o ceppi cellulari. Le cellule sono scelte in base alla capacità di crescita in coltura e alla stabilità della frequenza di mutazioni spontanee.

I saggi in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica. Tale sistema di attivazione metabolica non può simulare perfettamente le condizioni in vivo nel mammifero. Si evitino condizioni che porterebbero a risultati che non riflettono una mutagenicità intrinseca. Risultati positivi che non riflettono una mutagenicità intrinseca possono avere origine da cambiamenti di pH e di osmolalità o da elevati livelli di citotossicità (7).

Il saggio è usato per individuare potenziali mutageni e cancerogeni per i mammiferi. Molti composti positivi a questo test sono cancerogeni per i mammiferi, tuttavia la correlazione non è assoluta, ma dipende dalla classe chimica; vi sono sempre più elementi che inducono a ritenere che esistono cancerogeni che non sono rivelati da questi test perché sembrano agire attraverso altri meccanismi, non genotossici, o attraverso meccanismi che mancano nelle cellule batteriche (6).

Vedi anche Introduzione generale parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Mutazione “in avanti”: una mutazione genica in cui dal tipo parentale alla forma mutante si ha alterazione o perdita dell'attività enzimatica o della funzione della proteina codificata.

Mutageni che provano la sostituzione di coppie di basi: sostanze che provocano la sostituzione di una o più coppie di basi del DNA.

Mutageni che provocano la mutazione della fase di lettura: Sostanze che provocano l'inserzione o la delezione di una o più coppie di basi nella molecola di DNA.

Tempo di espressione fenotipica: il periodo durante il quale i prodotti genici inalterati scompaiono dalle cellule recentemente mutate.

Frequenza dei mutanti: numero di cellule mutanti diviso per il numero di cellule vitali.

Crescita totale relativa: aumento del numero di cellule nel tempo, in confronto con una popolazione di cellule di controllo; si calcola moltiplicando la crescita in sospensione rispetto al controllo negativo per l'efficienza di clonazione del controllo negativo.

Crescita relativa in sospensione: aumento del numero di cellule nel corso del periodo di espressione rispetto al controllo negativo.

Vitalità: l'efficienza di clonazione delle cellule trattate al momento del piastramento in condizioni selettive dopo il periodo di espressione.

Sopravvivenza: l'efficienza di clonazione delle cellule trattate al momento del piastramento, al termine del trattamento; il tasso di sopravvivenza viene espresso di solito in relazione alla sopravvivenza della popolazione di cellule di controllo.

1.3

PRINCIPIO METODOLOGICO

Le cellule carenti di timidina chinasi (TK) a causa della mutazione $TK^{+/+} \rightarrow TK^{-/-}$ sono resistenti agli effetti citotossici dell'analogo pirimidinico trifluorotimidina (TFT). Le cellule capaci di produrre la timidina chinasi sono sensibili alla TFT, che provoca l'inibizione del metabolismo cellulare e arresta la divisione cellulare. Di conseguenza le cellule mutanti sono in grado di proliferare in presenza di TFT, mentre le cellule normali, che contengono timidina chinasi, non lo sono. Analogamente le cellule carenti di HPRT o XPRT sono selezionate in base alla resistenza alla 6-tioguanina (TG) o alla 8-azaguanina (AG). Le proprietà della sostanza in esame devono essere studiate accuratamente quando in uno dei test di mutazione genica su cellule di mammifero si sperimenta l'analogo di una base o un composto correlato all'agente selettivo. Per esempio è necessario controllare la sospetta tossicità selettiva della sostanza in esame nei confronti di cellule mutanti e non mutanti. Quando sono sottoposte a test sostanze chimiche strutturalmente correlate all'agente selettivo (8), deve quindi essere confermata l'efficacia del sistema o dell'agente selettivo.

Le cellule in sospensione o in coltura monostrato sono esposte alla sostanza in esame, con e senza attivazione metabolica, per un tempo adeguato, poi reinoculate per determinare la citotossicità e permettere l'espressione fenotipica prima della selezione dei mutanti (9)(10)(11)(12)(13). La citotossicità è determinata di norma misurando l'efficacia relativa di clonazione (sopravvivenza) o la crescita totale relativa delle colture dopo il trattamento. Le colture trattate sono mantenute nel terreno di coltura per un periodo sufficiente, specifico per ciascun locus e tipo cellulare, per permettere l'espressione fenotipica subottimale delle mutazioni indotte. La frequenza di mutanti è determinata mediante insemminazione di un numero noto di cellule in terreno contenente l'agente selettivo, per rilevare le cellule mutanti, e in terreno non contenente l'agente selettivo, per determinare l'efficacia di clonazione (vitalità). Dopo un adeguato periodo di incubazione le colonie sono contate. La frequenza dei mutanti è costituita dal rapporto tra il numero di colonie mutanti nel terreno selettivo e in quello non selettivo.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 Preparazioni

1.4.1.1 *Cellule*

I tipi di cellule adatti sono molti, per esempio i subcloni delle cellule L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 o TK6. Le cellule usate per questo test devono essere notoriamente sensibili ai mutageni chimici e presentare elevata efficienza di clonazione e frequenza stabile delle mutazioni spontanee. Si controlli che non siano contaminate da micoplasma; non si usino i ceppi contaminati.

Il test deve essere impostato in modo da avere sensibilità ed efficacia predeterminate. Il numero di cellule, di colture e di concentrazioni della sostanza in esame deve riflettere tali parametri predefiniti (14). Ad ogni stadio del test il numero minimo di cellule vitali che sopravvivono al trattamento deve essere basato sulla frequenza delle mutazioni spontanee. Come regola generale si può usare un numero di cellule pari almeno al decuplo dell'inverso della frequenza di mutazioni spontanee. Si raccomanda comunque di utilizzare almeno 10^6 cellule. Dovrebbero essere disponibili risultati di precedenti esperienze sul sistema cellulare, che indichino che le prestazioni del test sono costanti.

1.4.1.2 *Terreni e condizioni di coltura*

Si usino adeguati terreni di coltura e condizioni di incubazione (recipienti di coltura, temperatura, concentrazione di CO₂, e umidità). I terreni devono essere scelti in funzione dei sistemi selettivi e al tipo di cellule. È particolarmente importante che le condizioni di coltura siano scelte in modo da garantire la crescita ottimale delle cellule durante il periodo di espressione e la capacità di formare colonie da parte delle cellule mutanti e non mutanti.

1.4.1.3 *Preparazione delle colture*

Le cellule provenienti da colture primarie sono inoculate in un terreno di coltura e incubate a 37°C. Prima di iniziare il test può rivelarsi necessario asportare dalle colture eventuali cellule mutanti preesistenti.

1.4.1.4 *Attivazione metabolica*

Le cellule dovrebbero essere esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un adeguato sistema di attivazione metabolica. Il sistema più comunemente usato è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), ricavata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici come Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18), o una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (19)(20).

La frazione post-mitocondriale è di solito usata a concentrazioni dell'1-10% v/v nel terreno dell'ultimo test. La scelta e le condizioni di un sistema di attivazione metabolica dipendono dalla classe chimica della sostanza in esame. In alcuni casi può essere opportuno utilizzare più di una concentrazione della frazione post-mitocondriale.

Vari nuovi procedimenti, tra cui la creazione mediante ingegneria genetica di linee cellulari che esprimono enzimi attivatori specifici, possono fornire le risorse potenziali per l'attivazione endogena. La scelta delle linee cellulari deve essere scientificamente motivata (p.es. dall'importanza dell'isoenzima del citocromo P450 per il metabolismo della sostanza in esame).

1.4.1.5 *Sostanza in esame /Preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

1.4.2 **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1 *Solvente/mezzo disperdente*

Il solvente/mezzo disperdente non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame e deve essere compatibile con la sopravvivenza delle cellule e con l'azione di S9. 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. Nell'esame di sostanze instabili in acqua, si usi un solvente organico anidro. L'acqua può essere rimossa mediante un setaccio molecolare.

1.4.2.2 *Concentrazioni di esposizione*

Fra i criteri da considerare nel determinare la concentrazione massima si citano la citotossicità, la solubilità nel sistema di prova e le variazioni di pH o di osmolalità.

La citotossicità deve essere determinata con e senza attivazione metabolica nel test principale, sulla base di un'indicatore adeguato dell'integrità e della moltiplicazione cellulare, come l'efficacia relativa di clonazione (tasso di sopravvivenza) o la crescita totale relativa. Può essere utile determinare la citotossicità e la solubilità in un esperimento preliminare.

Si usino almeno quattro concentrazioni analizzabili. In caso di sostanza citotossica, le concentrazioni devono andare dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica; in altri termini di norma le concentrazioni devono essere separate al massimo da un fattore compreso tra 2 e $\sqrt{10}$. Se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, il tasso di sopravvivenza relativa (efficacia relativa di clonazione) o la crescita totale relativa dovrebbero essere pari al 10-20% circa (e in ogni caso non inferiori al 10%). Per sostanze a basso grado di citotossicità, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 5 μ l/ml, 5 mg/ml o 0,01 M (si scelga il valore più basso).

Le sostanze difficilmente solubili devono essere sottoposte a test nelle condizioni di coltura fino al limite di solubilità e oltre. l'eventuale insolubilità va provata nel terreno dell'ultimo test. Può essere utile valutare la solubilità all'inizio e alla fine del trattamento in quanto essa può modificarsi nel corso dell'esperimento a causa della presenza di cellule, S9, siero ecc. L'insolubilità è rilevabile ad occhio nudo. Il precipitato non deve interferire con la valutazione.

1.4.2.3 *Controlli*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente o mezzo disperdente) trattati in parallelo, con e senza attivazione metabolica. Quando si usa l'attivazione metabolica, la sostanza usata per i controlli positivi deve esigere attivazione per dare una risposta mutagenica.

Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Condizione di attivazione metabolica	Locus	Sostanza	No. CAS	No.EINECS
Assenza di attivazione metabolica esogena	HPRT	Metansolfonato di etile	62-50-0	200-536-7
		Etilnitrosoarea	759-73-9	212-072-2
	TK (colonie piccole e grandi)	Metansolfonato di metile	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Metansolfonato d'etile	62-50-0
			Etilnitrosoarea	759-73-9
	Presenza di attivazione metabolica esogena	HPRT	3-Metilcolantrene	56-49-5
N-Nitrosodimetilammina			62-75-9	200-549-8
7,12-Dimetilbenzantracene			57-97-6	200-359-5
TK (colonie piccole e grandi)		Ciclofosfammide	50-18-0	200-015-4
		Ciclofosfammide monoidrato	6055-19-2	
		Benzo[a]pirene	50-32-8	200-028-5
		3-Metilcolantrene	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-Nitrosodimetilammina (per livelli elevati di S-9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pirene	50-32-8	200-028-5

Si possono usare altre sostanze adeguate per i controlli positivi, per esempio, la 5-bromo 2'-deossiridina [CAS n. 59-14-3, EINECS n. 200-415-9] se il laboratorio dispone di una base dati su tale sostanza, desunti da precedenti esperimenti. Si usino, se possibile, sostanze chimiche di una classe chimica correlata per i controlli positivi.

Si effettuino anche controlli negativi, con solvente o mezzo disperdente usato da solo sul terreno di coltura; i controlli vanno trattati come le colture che contengono la sostanza sottoposta al test. Si proceda inoltre a controlli non trattati, salvo che precedenti esperimenti dimostrino che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

1.4.3 **Procedura**

1.4.3.1 *Trattamento con la sostanza in esame*

Le cellule in proliferazione sono esposte alla sostanza in esame con e senza attivazione metabolica. L'esposizione deve protrarsi per un periodo adeguato (si considera che di norma tre-sei ore danno buoni risultati). Il tempo di esposizione può corrispondere a uno o più cicli cellulari.

Si possono usare colture in doppio o in singolo per ciascuna delle concentrazioni. Quando si usano colture singole, il numero di concentrazioni deve essere aumentato, per garantire un adeguato numero di colture per l'analisi (p.es. almeno 8 concentrazioni analizzabili). Le colture dei controlli negativi (solvente) devono essere in doppio.

I test con sostanze gassose o volatili devono essere condotti con metodi adeguati, per esempio in recipienti di coltura ermetici (21)(22).

1.4.3.2 *Misura del tasso di sopravvivenza, della vitalità e della frequenza delle mutazioni*

Al termine del periodo di esposizione, le cellule sono lavate e messe in coltura per determinarne la sopravvivenza e permettere l'espressione del fenotipo mutante. La misura della citotossicità mediante determinazione dell'efficacia relativa di clonazione (sopravvivenza) o della crescita totale relativa delle colture inizia di solito dopo il periodo di trattamento.

A ciascun locus corrisponde un determinato tempo minimo, necessario per permettere l'espressione subottimale del fenotipo dei mutanti neoindotti (HPRT e XPRT richiedono almeno 6-8 giorni, e TK almeno 2 giorni). Le cellule sono coltivate in terreno con e senza agenti selettivi per determinare rispettivamente il numero di mutanti e l'efficacia di clonazione. La vitalità (usata per il calcolo della frequenza di mutanti) si misura al termine del tempo di espressione, piastrandole colture in terreno non selettivo.

Se la sostanza in esame è positiva a test su L5178Y TK^{+/+}, la dimensione delle colonie deve essere rilevata almeno su una delle colture trattate (quella con la concentrazione positiva più alta) e sui controlli negativi e positivi. Se la sostanza in esame è negativa al test su L5178Y TK^{+/+}, la dimensione va rilevata sui controlli negativi e positivi. Negli studi condotti su TK6TK^{+/+}, si può rilevare anche la dimensione.

2. DATI

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati devono comprendere la determinazione di citotossicità e di vitalità, il conteggio delle colonie e la frequenza dei mutanti nelle colture trattate e di controllo. In caso di risposta positiva al test su L5178Y TK^{+/+}, si contano le colonie, distinguendo fra piccole e grandi, almeno per una concentrazione della sostanza in esame (concentrazione positiva massima) e per i controlli negativi e positivi. La natura molecolare e citogenetica dei due tipi di mutanti (quelli che producono colonie grandi e quelli che producono colonie piccole) è stata studiata particolareggiatamente (23)(24). Nel saggio TK^{+/+}, le colonie sono recensite sulla base del criterio della crescita: normale (colonie grandi) e lenta (colonie piccole) (25). Le cellule mutanti che hanno subito alterazioni genetiche più gravi hanno tempi di duplicazione più lunghi e formano di conseguenza colonie piccole. Il danno può andare dalla perdita dell'intero gene ad aberrazioni cromosomiche che si manifestano nel cariotipo. La presenza di mutanti che producono colonie piccole è stata messa in relazione con sostanze chimiche che causano aberrazioni cromosomiche rilevanti (26). Le cellule mutanti che hanno subito alterazioni meno gravi crescono a velocità simile a quella delle cellule parentali, formando colonie grandi.

Si indichi il tasso di sopravvivenza (efficacia relativa di clonazione) o la crescita totale relativa. La frequenza dei mutanti deve essere espressa come rapporto fra il numero delle cellule mutanti e quello delle cellule sopravvissute.

Si presentino i dati relativi alle singole colture. Tutti i dati inoltre vanno riassunti in una tabella.

Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva. I risultati ambigui devono essere chiariti mediante prove ulteriori, preferibilmente in condizioni di esperimento modificate. I risultati negativi devono essere confermati caso per caso. Se non si considera necessaria la conferma di risultati negativi, se ne fornisca la ragione. Se si procede a test ulteriori in caso di risultati ambigui o negativi, si dovrebbero modificare i parametri di studio, per ampliare la gamma delle condizioni valutate. Fra i parametri di studio modificabili si citano la differenza fra le dosi di concentrazione e le condizioni di attivazione metabolica.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento correlato alla dose o un aumento riproducibile della frequenza dei mutanti. Si consideri per prima cosa la rilevanza biologica dei risultati. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali, ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva.

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi, ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio in vitro di mutazione genica su cellule di mammifero indicano che la sostanza in esame induce mutazioni geniche nelle cellule di mammifero utilizzate nelle colture. Una correlazione fra l'entità della risposta positiva e la dose è estremamente significativa se riproducibile. Risultati negativi significano che nelle condizioni del test la sostanza in esame non induce mutazioni geniche nelle cellule di mammifero usate nella coltura.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente

- motivazione della scelta del mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota;

Cellule:

- tipo e origine delle cellule;
- numero di colture cellulari;
- eventuale numero dei trasferimenti;
- metodi usati per la conservazione della cultura cellulare, se del caso;
- assenza di micoplasma.

Condizioni di esperimento:

- criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture, per esempio i dati relativi alla citotossicità e ai limiti di solubilità, se disponibili;
- composizione del terreno, concentrazione di CO₂;
- concentrazione della sostanza in esame;
- volume del mezzo disperdente e delle sostanza in esame aggiunto;
- temperatura di incubazione;
- tempo di incubazione;
- durata del trattamento;
- densità delle cellule durante il trattamento;
- tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica, compresi i criteri di accettabilità;
- controlli positivi e negativi;
- durata del periodo di espressione (con numero di cellule inseminate, subcolture e protocolli di alimentazione, se del caso);
- agenti selettivi;
- criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;
- metodi usati per contare il numero di cellule vitali e mutanti;
- definizione delle colonie considerate, per dimensione e tipo (compresi i criteri in base a cui le colonie sono considerate "piccole" o "grandi", se del caso).

Risultati:

- segni di tossicità;
- segni di precipitazione;
- dati sul pH e l'osmolalità durante l'esposizione alla sostanza in esame, se determinati;
- dimensioni delle colonie, se registrate almeno per i controlli negativi e positivi;
- idoneità del laboratorio a individuare mutanti in colonie piccole con il sistema L5178Y TK^{+/+}, se del caso;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- eventuali analisi statistiche;
- dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi paralleli;
- dati sui precedenti controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi, con ranges, medie e deviazioni standard;
- frequenza dei mutanti.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

BIBLIOGRAFIA

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

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

B. 18

DANNO E RIPARAZIONE DEL DNA: SINTESI NON PROGRAMMATA DEL DNA — CELLULE DI MAMMIFERO IN VITRO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Il test della sintesi non programmata del DNA — Unscheduled DNA Synthesis (UDS) — misura la sintesi di riparazione del DNA dopo l'escissione e la rimozione di un tratto di DNA contenente la zona del danno indotto da agenti chimici e fisici. Il test si basa sull'incorporazione di timidina marcata con tritio ($^3\text{H-TdR}$) nel DNA di cellule di mammiferi che non si trovano nella fase S del ciclo cellulare. L'assunzione di $^3\text{H-TdR}$ può essere determinata per autoradiografia oppure mediante conteggio per scintillazione in fase liquida — liquid scintillation counting (LSC) — del DNA dalle cellule trattate. Le cellule di mammiferi in coltura, salvo nel caso che si faccia uso di epatociti primari di topo, vengono trattate con l'agente all'esame con e senza un sistema di attivazione metabolica esogena. La UDS può essere misurata anche in sistemi in vivo.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Le sostanze in esame e quelle di controllo o di riferimento vanno preparate in terreno di crescita ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati e poi ancora diluite in terreno di crescita prima di essere utilizzate per il test. La concentrazione finale del veicolo non deve produrre alcun effetto sulla vitalità delle cellule.

Nel test possono essere utilizzate colture primarie di epatociti di ratto, di linfociti umani o di linee cellulari stabilizzate (ad esempio fibroblasti diploidi umani).

È opportuno esporre le cellule alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica.

Condizioni sperimentali

Numero di colture

Sono necessarie almeno due colture di cellule per l'autoradiografia e sei colture (o meno, se giustificato scientificamente) per le determinazioni LSC e UDS per ogni punto sperimentale.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno includere in ciascun esperimento controlli simultanei positivi e negativi (non trattati e/o del solo veicolo), con e senza attivazione metabolica.

Esempi di controlli positivi per il test su epatociti di ratto sono il 7,12-DMBA (7,12-dimetilbenzotracene) e il 2-AAF (2-acetilaminofluorene). Nel caso delle linee cellulari stabilizzate un esempio di controllo positivo sia per le determinazioni autoradiografiche che per le determinazioni LSC effettuate senza attivazione metabolica è la 4-NQO (4-nitrochinolina-N-ossido); la N-dimetilnitrosamina è a sua volta un esempio di composto per controllo positivo quando sia fatto uso di sistemi di attivazione metabolica.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di concentrazioni multiple della sostanza in esame in una gamma adeguata ai fini della determinazione della risposta. La concentrazione più elevata deve dar luogo a qualche effetto citotossico. I composti relativamente insolubili in acqua vanno saggati fino al loro limite di solubilità. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza in esame va determinata caso per caso.

Cellule

Per il mantenimento delle colture è opportuno fare uso di terreni di crescita, di concentrazioni di CO₂ e di condizioni di temperatura e di umidità appropriate. Le linee cellulari stabilizzate devono essere controllate periodicamente per escludere la presenza di contaminazione da micoplasma.

Attivazione metabolica

Con le colture primarie di epatociti non si fa uso di sistemi di attivazione metabolica. Le linee cellulari stabilizzate ed i linfociti vengono esposti alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica.

Procedimento

Preparazione delle colture

Le linee cellulari stabilizzate vengono generate da coltura stock (ad esempio per tripsinizzazione o mediante separazione per scuotimento), seminate in recipienti di coltura a densità appropriata ed incubate a 37 °C.

Colture a breve termine di epatociti di ratto vengono preparate dando modo a epatociti dissociati di fresco in un terreno appropriato di attaccarsi alla superficie di crescita. Le colture di linfociti umani vengono preparate secondo tecniche appropriate.

Trattamento delle colture con la sostanza in esame

Epatociti primari di ratto

Gli epatociti di ratto isolati di fresco vengono trattati con la sostanza in esame in un terreno contenente ³H-TdR per una durata appropriata. Al termine del periodo di trattamento le cellule vanno tolte mediante filtraggio dal terreno, risciacquate, fissate ed essiccate. I vetrini vanno immersi in emulsione autoradiografica (alternativamente si possono usare pellicole adatte), esposti, sviluppati, colorati ed enumerati.

Linee cellulari stabilizzate e linfociti

Tecniche autoradiografiche: Le colture di cellule vengono esposte alla sostanza in esame per una durata appropriata e successivamente trattate con ³H-TdR. La durata sarà determinata dalla natura della sostanza, dall'attività del sistema metabolizzante e dal tipo delle cellule. Per rilevare il valore massimo di UDS, è opportuno aggiungere ³H-TdR contemporaneamente alla sostanza all'esame, ovvero entro pochi minuti dall'esposizione alla sostanza stessa. La scelta fra i suddetti due procedimenti sarà fatta in relazione alla possibilità di interazioni fra la sostanza all'esame e ³H-TdR.

Al fine di poter distinguere fra UDS e la replicazione semi-conservativa di DNA si può inibire quest'ultima, ad esempio facendo uso di un terreno deficiente di arginina, a basso contenuto di siero o con idrossiurea nel mezzo di coltura.

Misure LSC di UDS: Prima del trattamento con la sostanza in esame è opportuno bloccare nel modo che si è descritto sopra l'entrata delle cellule nella fase S. Le cellule vengono poi esposte alla sostanza in esame nel modo che si è descritto per l'autoradiografia. Al termine del periodo di incubazione si estrae il DNA dalle cellule e si determinano il contenuto totale di DNA e la misura della incorporazione di ³H-TdR.

Occorre rilevare che quando si fa uso delle tecniche sopra descritte di linfociti umani, la soppressione della replicazione semi-conservativa di DNA non è necessaria in colture non stimolate.

Analisi

Determinazioni autoradiografiche

Nella determinazione di UDS nelle cellule in coltura non si contano i nuclei in fase S. È opportuno contare almeno 50 cellule per concentrazione. Le lastre vanno codificate prima del conteggio. È opportuno contare su ciascuna piastrina diversi campi a caso interamente separati tra loro. Per la determinazione della quantità di incorporazione di ^3H -TdR nel citoplasma è bene contare nel citoplasma di ciascuna cellula conteggiata tre aree delle dimensioni del nucleo.

Determinazioni LSC

Nelle determinazioni LSC UDS occorre fare uso di un numero adeguato di colture per ogni concentrazione e per i controlli.

Tutti i risultati dovrebbero essere confermati in un esperimento indipendente.

2. DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle.

2.1. Determinazioni autoradiografiche

Della entità dell'incorporazione di ^3H -TdR nel citoplasma e del numero dei granuli osservati nel nucleo delle cellule va presa nota separatamente.

Per descrivere la distribuzione dell'entità dell'incorporazione di ^3H -TdR nel citoplasma e del numero dei granuli per nucleo può essere fatto riferimento alla media, alla mediana ed al modo.

2.2. Determinazioni LSC

Per le determinazioni LSC, l'incorporazione di ^3H -TdR va indicata in termini di dpm/ μg di DNA. Il valore medio di dpm/ μg di DNA con la deviazione standard può essere usato per descrivere la distribuzione della incorporazione.

I dati devono essere valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- cellule usate, densità e numero dei passaggi al momento del trattamento, numero delle colture di cellule,
- metodi usati per il mantenimento delle colture di cellule, con indicazione del terreno, della temperatura e della concentrazione di CO_2 ,
- sostanza in esame, veicolo, concentrazioni e ragioni della scelta delle concentrazioni usate nella determinazione,
- dettagli riguardanti i sistemi di attivazione metabolica,
- programmi di trattamento,
- controlli positivi e negativi,

- tecnica autoradiografica usata,
- procedimenti usati per bloccare l'entrata delle cellule nella fase S,
- procedimenti usati per l'estrazione di DNA e per la determinazione del contenuto totale di DNA nelle determinazioni LSC,
- relazione dose-risposta se del caso,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 19

SAGGIO DEGLI SCAMBI TRA CROMATIDI FRATELLI IN VITRO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Quello degli scambi tra cromatidi fratelli — Sister chromatid exchange (SEC) — è un test a breve termine per la rilevazione degli scambi reciproci di DNA fra due cromatidi fratelli di un cromosoma in duplicazione. Gli SCE rappresentano l'interscambio di prodotti della replicazione di DNA in corrispondenza di loci apparentemente omologhi. Il processo di scambio comporta presumibilmente la rottura e la riunione di DNA, ma sulla sua base molecolare non si conosce in realtà molto. La rilevazione degli SCE richiede qualche mezzo per marcare in modo differenziale i cromatidi fratelli, e questo può essere ottenuto mediante incorporazione di bromodeossiridina (BrdU) nel DNA cromosomico per due cicli cellulari.

Culture in vitro di cellule di mammiferi vengono esposte alla sostanza in esame con e senza un sistema esogeno di attivazione metabolica dei mammiferi, se appropriato, e poste in coltura per due cicli di replicazione in terreno contenente BrdU. Dopo un trattamento con un inibitore del fuso (ad esempio la colchicina) per accumulare cellule in uno stadio di mitosi di tipo metafase (c-metafase), le cellule vengono raccolte e si procede alle preparazioni cromosomiche.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

- Nel saggio si possono usare colture primarie (linfociti umani) o linee cellulari stabilizzate (ad esempio cellule di ovario di hamster cinese). Le linee cellulari devono essere controllate per escludere la presenza di contaminazione da Mycoplasma.
- Vanno usati terreni di coltura e condizioni di incubazione (temperatura, recipienti di coltura, concentrazione di CO₂ ed umidità) appropriati.
- Le sostanze in esame possono essere preparate in terreni di coltura ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati prima del trattamento delle cellule. La concentrazione finale dei veicoli nei sistemi di coltura non deve influire in maniera significativa sulla vitalità o sul tasso di crescita delle cellule, ed è parallelamente opportuno verificare la frequenza degli SCE per mezzo di un controllo con solvente.
- È opportuno esporre le cellule alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica di mammiferi. Alternativamente, ove si faccia uso di tipi di cellule con attività metabolica endogena, l'intensità e la natura dell'attività devono essere appropriate per la classe chimica sottoposta all'esame.

Condizioni sperimentali

Numero di colture

Per ciascun punto sperimentale dovrebbero essere usate colture almeno in duplicato.

Uso di controlli positivi e negativi

È opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli positivi, facendo uso sia di un composto ad azione diretta che di un composto richiedente attivazione metabolica, ed è opportuno anche effettuare un controllo del veicolo.

Quali esempi di sostanze che si prestano ad essere usate come controlli positivi si possono citare:

- come composto ad azione diretta:
 - l'etilmetansulfonato,
- come composto ad azione indiretta:
 - la ciclofosfamide.

Se del caso, può essere incluso nell'esperimento un controllo positivo supplementare della medesima classe chimica della sostanza in esame.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di almeno tre concentrazioni adeguatamente intervallate della sostanza in esame. La concentrazione più elevata deve dar luogo ad un effetto tossico significativo, ma deve ancora consentire il verificarsi di una replicazione adeguata delle cellule. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza in esame va determinata caso per caso.

Procedimento

Preparazione delle colture

Linee cellulari stabilizzate vengono generate da colture stock (ad esempio per tripsinizzazione o mediante distacco per scuotimento), seminate in recipienti di coltura a densità appropriata ed incubate a 37 °C. Nel caso di coltura monostrato, il numero delle cellule per ogni recipiente di coltura va regolato in modo che le colture non siano confluenti in misura molto maggiore del 50 % al momento della raccolta. Alternativamente, le cellule possono essere usate in forma di coltura in sospensione. Le colture di linfociti umani sono ottenute da sangue eparinizzato secondo tecniche appropriate ed incubate a 37 °C.

Trattamento

Vengono esposte alla sostanza in esame per una durata adeguata cellule in uno stadio di crescita esponenziale; nella maggior parte dei casi può essere efficace una durata da una a due ore, ma la durata del trattamento può in taluni casi essere prolungata fino a due cicli cellulari completi. Le cellule non aventi una sufficiente attività metabolica endogena vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica. Al termine del periodo di esposizione le cellule vengono lavate da ogni traccia della sostanza in esame e coltivate per due cicli di replicazione in presenza di BrdU. In un procedimento alternativo si possono esporre le cellule contemporaneamente alla sostanza in esame e al BrdU per la durata completa di coltura di due cicli cellulari. Le colture di linfociti umani vengono trattate mentre si trovano in condizione semisincrona. Le cellule vengono analizzate alle loro seconda divisione dopo il trattamento, per assicurarsi che siano state esposte alla sostanza negli stadi più sensibili del ciclo cellulare. Tutte le colture alle quali si aggiunge BrdU, vanno manipolate nell'oscurità o in luce attenuata di lampade ad incandescenza fino al momento della raccolta delle cellule, allo scopo di ridurre per quanto possibile la fotolisi del DNA contenente BrdU.

Raccolta delle cellule

Le colture di cellule vengono trattate con un inibitore del fuso (ad esempio colchicina) da 1 a 4 ore prima della raccolta. Ciascuna coltura viene raccolta e trattata separatamente per la preparazione dei cromosomi.

Preparazione e colorazione dei cromosomi

I preparati di cromosomi vengono ottenuti secondo le tecniche citogenetiche correnti. La colorazione dei vetrini per l'evidenziazione degli SCE può essere effettuata secondo diverse tecniche (ad esempio con il metodo della fluorescenza più Giemsa).

Analisi

Il numero di cellule analizzate deve essere basato sulla frequenza spontanea di controllo degli SCE. Normalmente si analizzano per gli SCE almeno 25 metafasi ben spaziate per coltura. I vetrini vengono codificati prima dell'analisi. Nei linfociti umani si analizzano soltanto metafasi contenenti 46 centromeri. Nelle linee cellulari stabilizzate si analizzano a loro volta soltanto metafasi contenenti ± 2 centromeri del numero modale. È opportuno indicare se il salto di marcatura a livello del centromero viene o non viene conteggiato come SCE. I risultati dovrebbero essere confermati in un esperimento indipendente.

2. DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle. Il numero degli SCE per metafase e il numero degli SCE per cromosoma vanno indicati separatamente per tutte le colture trattate e quelle di controllo. I dati devono essere definiti secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- cellule usate, metodi di mantenimento della coltura cellulare,
- condizioni sperimentali: composizione dei mezzi, concentrazione di CO₂, concentrazione della sostanza all'esame, veicolo usato, temperatura di incubazione, tempo di trattamento, inibitore del fuso usato, sua concentrazione e durata del trattamento connesso, tipo di sistema di attivazione di mammiferi usato, controlli positivi e negativi,
- numero di colture di cellule per punto sperimentale,
- dettagli della tecnica usata per la preparazione delle lastre,
- numero delle metafasi analizzate (indicazione separata dei dati per ciascuna coltura),
- numero medio di SCE per cellula e per cromosoma (indicazione separata dei dati per ciascuna coltura),
- criteri per il riscontro degli SCE,
- criteri di selezione delle dosi,
- relazione dose/risposta se del caso,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 20

SAGGIO DEI LETALI RECESSIVI LEGATI AL SESSO: DROSOPHILA MELANOGASTER

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Il saggio dei letali recessivi legati al sesso — sex-linked recessive lethal (SLRL) — nel quale è fatto uso della *Drosophila melanogaster*, permette di rilevare l'induzione sia di mutazioni puntiformi che di piccole delezioni nella linea germinale dell'insetto. Si tratta di un saggio capace di rivelare mutazioni in circa 800 loci sul cromosoma X; questa cifra rappresenta circa l'80 % di tutti i loci del cromosoma X; quest'ultimo rappresenta a sua volta circa un quinto dell'intero genoma aploide.

Le mutazioni nel cromosoma X nella *D. melanogaster* sono espresse fenotipicamente nei maschi portanti il gene mutante. Quando la mutazione è letale nella condizione emizigote, la sua presenza si desume dall'assenza di una delle due classi di discendenza maschile che sono normalmente prodotte da una femmina eterozigote. Il saggio SLRL si basa sulla disponibilità di cromosomi specificamente marcati.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Ceppi

Possono essere usati maschi di un ceppo ben definito di tipo selvatico e femmine del ceppo Muller-5. Possono altresì essere usati altri ceppi di femmine marcate in modo appropriato con cromosomi X multipli invertiti.

Sostanza in esame

Le sostanze in esame vanno disciolte in acqua. Le sostanze non solubili in acqua possono essere disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati (ad esempio una miscela di etanolo e Tween-60 o 80), e successivamente diluite in acqua o in soluzione salina prima della somministrazione. È opportuno evitare quale solvente il dimetilsolfossido (DMSO).

Numero di animali

Il saggio va programmato con una sensibilità ed una potenza predeterminati. Sul numero di cromosomi trattati che devono essere analizzati influirà fortemente la frequenza delle mutazioni spontanee osservata nel controllo appropriato.

Vie di somministrazione

L'esposizione può essere orale, per iniezione o per esposizione a gas o a vapori. La somministrazione della sostanza in esame può essere fatta in forma di soluzione zuccherina. Se necessario, le sostanze possono essere disciolte in soluzione di NaCl allo 0,7% ed iniettate nel torace o nell'addome.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno includere nell'esperimento controlli negativi (del solvente) e positivi. Ove tuttavia siano disponibili appropriati dati storici di controllo del laboratorio, non sono necessari controlli concomitanti.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di tre concentrazioni. Per una valutazione preliminare può essere fatto uso di una sola concentrazione della sostanza in esame, che può essere quella massima tollerata o quella che dà luogo ad una qualche indicazione di tossicità. Per le sostanze non tossiche è opportuno adottare l'esposizione alla concentrazione massima praticabile.

Procedimento

Maschi di tipo selvatico (di età da 3 a 5 giorni) vengono trattati con la sostanza in esame e accoppiati individualmente con un numero maggiore di femmine vergini dello stock Muller-5 o di altro stock marcato in maniera appropriata (con cromosomi X multipli invertiti). Le femmine vengono sostituite con vergini fresche ogni due, tre giorni così da coprire l'intero ciclo delle cellule germinali. Sulla prole di dette femmine viene effettuata l'analisi degli effetti letali corrispondenti agli effetti sullo sperma maturo, sugli spermatidi di stadio medio o avanzato, sugli spermatidi precoci, sugli spermaticiti e sugli spermatogoni al momento del trattamento.

Le femmine eterozigoti F_1 degli incroci di cui sopra sono fatte accoppiare individualmente (ossia in ragione di una femmina per bottiglietta) con i loro fratelli. Nella generazione F_2 si procede su ciascuna coltura all'analisi dell'assenza di maschi del tipo selvatico. Se da una femmina F_1 appare essere derivata una coltura portante un letale nel cromosoma X dei genitori (ossia se non si osservano maschi con il cromosoma trattato) si devono mettere alla prova figlie di quella femmina con il medesimo genotipo per stabilire se la letalità si ripete nella generazione successiva.

2. DATI

I dati devono essere disposti in forma di tabelle con indicazione del numero dei cromosomi X saggiati, del numero dei maschi non fertili e del numero dei cromosomi letali per ciascuna concentrazione di esposizione e per ciascun periodo di accoppiamento per i singoli maschi trattati. Deve essere riportato per ciascun maschio il numero degli aggregati di differenti dimensioni. I risultati del test devono essere confermati in un esperimento a parte.

Per la valutazione del saggio dei letali recessivi legati al sesso deve essere fatto uso di metodi statistici appropriati. L'agglomerazione di letali recessivi aventi origine da un medesimo maschio dev'essere considerata e valutata secondo criteri statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- stock: stock o ceppi di *Drosophila* usati, età degli insetti, numero dei maschi trattati, numero dei maschi sterili, numero di colture F_2 costituite, numero di colture F_2 senza progenie, numero di cromosomi portanti un letale individuati per ciascuno stadio delle cellule germinali,
- criteri per la definizione delle dimensioni dei gruppi trattati,
- condizioni di effettuazione del saggio: descrizione dettagliata dei programmi di trattamento e di campionatura, livelli di esposizione, dati della tossicità, controlli negativi (del solvente) e positivi, se del caso,
- criteri per il riscontro delle mutazioni letali,
- relazione esposizione/effetto se del caso,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 21

SAGGIO IN VITRO DI TRASFORMAZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Per la rilevazione di cambiamenti fenotipici in vitro indotti da sostanze chimiche associate con una trasformazione maligna in vivo può essere fatto uso di sistemi di coltura di cellule di mammiferi. Fra le cellule più largamente usate figurano le cellule C3H10T $\frac{1}{2}$, 3T3, SHE, le cellule di ratto Fisher; i saggi si fondano su cambiamenti della morfologia cellulare, sulla formazione di foci e sulla perdita della dipendenza da ancoraggio in agar semisolido. Esistono anche altri sistemi meno largamente usati i quali mettono in luce altri tipi di cambiamenti fisiologici o morfologici nelle cellule successivamente all'esposizione a sostanze chimiche carcinogene. Nessuno degli eventi finali dei test in vitro ha un legame meccanicistico accertato con il cancro. Alcuni fra i saggi sono in grado di evidenziare agenti promotori dei tumori. La citotossicità può essere determinata attraverso la misura dell'effetto della sostanza in esame sulla capacità di formazione di colonie (efficienza di clonaggio) o sul tasso di crescita delle colture. La misurazione della citotossicità ha lo scopo di stabilire se l'esposizione alla sostanza in esame abbia avuto carattere rilevante dal punto di vista tossicologico, ma non può essere usata per calcolare la frequenza della trasformazione in tutti i saggi poiché alcuni di essi possono comportare un'incubazione prolungata e/o un ripiastramento delle cellule.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Cellule

È disponibile tutta una varietà di linee cellulari o di cellule primarie, in relazione al saggio di trasformazione che si intende effettuare. Il ricercatore deve accertarsi che nel saggio che si sta effettuando le cellule presentino dopo esposizione a carcinogeni noti l'appropriato cambiamento fenotipico, e che il saggio nel suo laboratorio sia di provata e documentata validità e attendibilità.

Terreni di coltura

Devono essere usati terreni di coltura e condizioni sperimentali appropriati per il saggio di trasformazione che si effettua.

Sostanza in esame

Le sostanze in esame possono essere preparate in mezzi di coltura ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati, prima del trattamento delle cellule. La concentrazione finale del veicolo nel sistema di coltura non deve influire sulla vitalità o sul tasso di crescita delle cellule né sull'incidenza della trasformazione.

Attivazione metabolica

Le cellule vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica dei mammiferi. Alternativamente, quando sia fatto uso di tipi di cellule che possiedono un'attività metabolica endogena deve essere accertato che la natura dell'attività stessa sia appropriata per la classe chimica sottoposta all'esame.

Condizioni sperimentali

Uso di controlli positivi e negativi

È opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli positivi, con impiego sia di un composto ad azione diretta che di un composto richiedente attivazione metabolica; è altresì opportuno fare uso di un controllo negativo (del solvente).

Quali esempi di sostanze che si prestano ad essere usate come controlli positivi si possono citare:

- sostanze ad azione diretta:
 - etilmetansulfonato,
 - β -propiolattone;
- composti richiedenti un'attivazione metabolica:
 - 2-acetilaminofluorene,
 - 4-dimetilaminoazobenzene,
 - 7,12-dimetilbenzantracene.

Se del caso, è opportuno includere un controllo positivo supplementare della medesima classe chimica del composto in esame.

Concentrazioni

È opportuno usare varie concentrazioni della sostanza in esame. Dette concentrazioni devono dar luogo ad un effetto tossico correlato con la concentrazione, nel senso che la concentrazione più elevata produce un livello ridotto di sopravvivenza, mentre alla concentrazione più bassa la sopravvivenza è approssimativamente dello stesso ordine che nel controllo negativo. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedure appropriate. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza va determinata caso per caso.

Procedimento

L'esposizione delle cellule deve avere una durata appropriata in relazione al sistema di saggio adottato, e questo, quando l'esposizione è prolungata, può comportare un ridosaggio con cambio del mezzo e, se necessario, con miscela di attivazione metabolica fresca. Le cellule non aventi un'attività metabolica endogena sufficiente vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema di attivazione metabolica appropriato. Al termine del periodo di esposizione le cellule vengono lavate da ogni traccia della sostanza in esame e coltivate in condizioni appropriate per la comparsa del fenotipo trasformato che si sta studiando, e viene infine determinata l'incidenza della trasformazione. Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente.

2. DATI

I dati vanno presentati in forma di tabella e possono assumere forme diverse a seconda del tipo di determinazione effettuato, ad esempio numero di foci o di colonie per piastre, piastre positive o numero delle cellule trasformate. La sopravvivenza va espressa quale percentuale dei livelli di controllo, e la frequenza della trasformazione sotto forma del numero di trasformanti in relazione al numero dei sopravvissuti. I dati devono essere valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- tipo di cellule usato, numero delle colture cellulari, metodi di mantenimento delle colture,
- condizioni di effettuazione del saggio, concentrazione della sostanza in esame, veicolo usato, temperatura di incubazione, durata dell'incubazione, durata e frequenza del trattamento, densità delle cellule durante il trattamento, tipo di sistema di attivazione metabolica esogena usato, controlli positivi e negativi, specificazione del fenotipo studiato, sistema selettivo usato (se del caso), criteri per la scelta delle dosi,

- metodo seguito per l'enumerazione delle cellule vitali e delle cellule trasformate,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 22

SAGGIO DEI LETALI DOMINANTI NEI RODITORI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Gli effetti dei letali dominanti provocano la morte dell'embrione o del feto. L'induzione di letali dominanti per effetto dell'esposizione ad una sostanza chimica indica che la sostanza in causa ha attaccato il tessuto germinale della specie all'esame. È generalmente ammesso che i letali dominanti sono dovuti a un danno cromosomico (anomalie strutturali e numeriche). La morte dell'embrione in femmine trattate può altresì essere il risultato di effetti tossici.

Come criterio generale si espongono animali maschi al composto in esame e si accoppiano i medesimi con femmine vergini non trattate. I diversi stadi delle cellule germinali possono essere saggiati separatamente mediante l'osservanza di intervalli in successione negli accoppiamenti. L'aumento degli impianti morti per femmina nel gruppo trattato in confronto con gli impianti morti per femmina nel gruppo di controllo rispecchia la perdita successiva all'impianto. La perdita anteriore all'impianto può essere stimata sulla base di conteggi dei corpi lutei oppure attraverso il raffronto del totale degli impianti per femmina nel gruppo trattato e in quello di controllo. L'effetto letale dominante complessivo è rappresentato dalla somma della perdita anteriore e successiva all'impianto. Il calcolo dell'effetto letale dominante complessivo si basa sul raffronto fra gli impianti vivi per femmina nel gruppo trattato e gli impianti vivi per femmina nel gruppo di controllo. Una riduzione del numero di impianti a determinati intervalli può essere il risultato dell'uccisione di cellule (vale a dire, di spermatozoi e/o di spermagoni).

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

In tutti i casi in cui ciò sia possibile, le sostanze in esame vanno disciolte o poste in sospensione in soluzione salina isotonica. Le sostanze non solubili in acqua possono essere disciolte o sospese in solventi appropriati. Il solvente usato non deve né interferire con la sostanza in esame né produrre effetti tossici. È opportuno fare uso di preparazioni fresche della sostanza in esame.

Condizioni sperimentali

Vie di somministrazione

Il composto in esame va in generale somministrato una sola volta. Sulla base di informazioni tossicologiche può essere adottato un programma di trattamento ripetuto. Le vie di somministrazione correnti sono l'intubazione orale e l'iniezione intraperitoneale. Possono altresì essere appropriate altre vie di somministrazione.

Animali da esperimento

Quali specie da sottoporre al saggio sono raccomandati i ratti o i topi. Animali sani nella piena maturità sessuale vengono randomizzati ed assegnati al gruppo per il trattamento e al gruppo di controllo.

Numero e sesso

Occorre fare uso di un numero adeguato di maschi trattati in modo da tener conto della variazione spontanea del carattere biologico di cui si effettua la valutazione. Il numero scelto deve essere basato sulla sensibilità di rilevazione e sul valore di significatività determinati in precedenza. Ad esempio, in un esperimento tipico, il numero dei maschi per ciascun gruppo/dose deve essere sufficiente per dare da 30 a 50 femmine gravide per ogni intervallo di accoppiamento.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno in linea generale includere in ciascun esperimento dei controlli simultanei positivi e negativi (del veicolo). Quando siano disponibili risultati accettabili di controlli positivi relativi ad esperimenti effettuati di recente nel medesimo laboratorio, al posto di un controllo positivo simultaneo può essere fatto uso di detti risultati.

Le sostanze per i controlli positivi vanno usate a dosi opportunamente basse (ad esempio MMS, intraperitoneale, a 10 mg/kg) allo scopo di dimostrare la sensibilità del saggio.

Livelli delle dosi

Di norma va fatto uso di tre livelli di dosaggio. La dose più alta deve produrre segni di tossicità o di riduzione della fertilità negli animali trattati. In taluni casi può essere sufficiente un solo livello elevato di dosaggio.

Saggio del limite

Le sostanze non tossiche vanno saggiate a 5 g/kg con una sola somministrazione o a 1 g/kg/giorno con somministrazione ripetuta.

Procedimento

Sono possibili vari schemi di trattamento. Il tipo di trattamento più largamente usato è quello della somministrazione singola della sostanza in esame. Possono essere applicati anche altri schemi di trattamento.

I singoli maschi vengono accoppiati in successione con una o due femmine vergini non trattate ad intervalli appropriati dopo il trattamento. Le femmine vanno lasciate con i maschi almeno per la durata di un ciclo di estro o fino a che sia avvenuto l'accoppiamento, da determinare in base alla presenza di sperma nella vagina o di un tappo vaginale.

Il numero degli accoppiamenti successivi al trattamento è determinato in base al programma di trattamento e deve essere tale che vengano esaminati dopo il trattamento tutti gli stadi delle cellule germinali.

Le femmine vengono sacrificate nella seconda metà del periodo di gravidanza, e si procede all'esame del contenuto uterino per la determinazione del numero degli impianti morti e viventi. Si possono anche esaminare le ovaie per determinare il numero dei corpi lutei.

2.

DATI

I dati devono essere disposti in forma di tabelle con indicazione del numero dei maschi, del numero delle femmine gravide e del numero delle femmine non gravide. I risultati di ciascun accoppiamento, con indicazione dell'identità dei singoli soggetti maschi e femmine, vanno riportati individualmente. Per ciascuna femmina va indicata la settimana di accoppiamento, e per i maschi il livello di dosaggio, nonché rispettivamente le frequenze degli impianti vivi e degli impianti morti. Il calcolo dell'effetto complessivo letale dominante si basa sul raffronto fra gli impianti vivi per femmina nel gruppo sottoposto al saggio e gli impianti vivi per femmina nel gruppo di controllo. Il rapporto fra gli impianti morti e quelli vivi del gruppo trattato posto a raffronto con il rapporto corrispondente del gruppo di controllo viene analizzato ai fini dell'indicazione della perdita successiva all'impianto.

Se i dati sono registrati come morti precoci e morti tardive, ciò deve risultare dalle tabelle. Se la perdita anteriore all'impiantazione è stimata, ne deve essere dato ragguaglio. La perdita anteriore all'impianto può essere calcolata come discrepanza fra il numero dei corpi lutei e il numero degli impianti, ovvero come riduzione del numero medio di impianti per utero in confronto con gli accoppiamenti di controllo. I dati vengono valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie, ceppo, età e peso degli animali usati, numero degli animali dell'uno e dell'altro sesso nei gruppi sottoposti al saggio e nei gruppi di controllo,
- sostanza in esame, solvente, livelli di dosaggio saggiati e ragioni della scelta delle dosi, controlli negativi e positivi, dati della tossicità,
- via e durata dell'esposizione,
- ordine degli accoppiamenti,
- metodo usato per stabilire l'avvenuto accoppiamento,
- metodo del sacrificio,
- criteri per l'analisi dei letali dominanti,
- relazione dose/risposta, se del caso,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B.23. TEST DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUGLI SPERMATOGONI DI MAMMIFERO

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 INTRODUZIONE

Il saggio in vivo di aberrazione cromosomica su spermatogoni di mammifero è destinato ad identificare sostanze che causano aberrazioni cromosomiche strutturali nelle cellule spermatogoniche di mammifero (1)(2)(3)(4)(5). Le aberrazioni strutturali possono essere di due tipi, cromosomiche o cromatidiche. La maggior parte dei mutageni chimici induce aberrazioni del tipo cromatidico, ma si verificano anche aberrazioni di tipo cromosomico. Il metodo non è destinato a misurare le aberrazioni numeriche e di norma non è usato a tal fine. Le mutazioni cromosomiche ed i fenomeni ad esse correlati sono causa di numerose malattie genetiche umane.

Questo saggio misura fenomeni cromosomici negli spermatogoni e pertanto dovrebbe permettere di prevedere l'induzione di mutazioni ereditabili nelle cellule germinali.

Per tale saggio si usano di norma roditori. Si tratta di test citogenetici in vivo, che rivelano aberrazioni cromosomiche nelle mitosi degli spermatogoni. Altre cellule bersaglio non sono oggetto del presente saggio.

Per rilevare aberrazioni di tipo cromatidico in cellule spermatogoniche, è necessario esaminare la prima divisione cellulare mitotica dopo il trattamento, prima che tali aberrazioni scompaiano nelle successive divisioni cellulari. L'analisi dei cromosomi allo stadio della meiosi, per individuare aberrazioni cromosomiche allo stadio della diacinesi-metafase I, quando le cellule trattate diventano spermatozoi, può fornire ulteriori informazioni sugli spermatogoni trattati.

Questo saggio in vivo è inteso a verificare se i mutageni delle cellule somatiche siano attivi anche nelle cellule germinali. Inoltre il saggio sugli spermatogoni è idoneo a valutare il rischio di mutagenicità in quanto permette di tener conto di fattori di metabolismo in vivo, di farmacocinetica e di processi di riparazione del DNA.

I testicoli contengono varie generazioni di spermatogoni, che presentano sensibilità diverse al trattamento chimico. Le aberrazioni individuate rappresentano pertanto una risposta globale delle popolazioni di spermatogoni trattati, tra cui predominano le cellule spermatogoniche differenziate, più numerose. Le varie generazioni di spermatogoni sono o non sono esposte alla circolazione generale in funzione della posizione all'interno del testicolo, a causa della barriera fisica e fisiologica costituita dalle cellule di Sertoli e dalla barriera ematotesticolare.

Il test non è idoneo se è evidente che la sostanza in esame o un metabolita reattivo non raggiungono il tessuto bersaglio.

Vedi anche Introduzione generale parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Aberrazione di tipo cromatidico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromatide o nella rottura e ricongiunzione di cromatidi.

Aberrazione di tipo cromosomico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatidi in uno stesso punto.

Salto (gap): lesione acromatica di ampiezza inferiore a un cromatide, con minimo disallineamento dei cromatidi.

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caratteristico della specie.

Poliploidia: numero di cromosomi multiplo superiore a due del numero aploide (cioè 3n, 4n ecc.).

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase della divisione cellulare, che si presenta con delezioni, riordinamenti intercromosomici e intracromosomici.

1.3 PRINCIPIO METODOLOGICO

Gli animali sono esposti alle sostanze in esame tramite una via di esposizione adeguata e sono quindi sacrificati a tempo debito, dopo somministrazione di un inibitore della metafase (p.es. colchicina o Colcemid®). Sono poi approntate e sottoposte a un processo di colorazione preparazioni cromosomiche provenienti dalle cellule germinali, e se ne analizzano le cellule in metafase per determinare le aberrazioni cromosomiche.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 Preparazioni

1.4.1.1 *Scelta delle specie animali*

Criceti cinesi e topi maschi sono gli animali più comunemente usati, ma si possono usare maschi di altre specie di mammiferi. Si scelgano individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. All'inizio dello studio la variazione di peso tra gli animali deve essere minima e non superare \pm 20% del peso medio.

1.4.1.2 *Condizioni di stabulazione e alimentazione*

Valgono le condizioni generali citate nell'Introduzione generale alla parte B; l'umidità ideale è pari al 50-60%.

1.4.1.3 *Preparazione degli animali*

Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere disposte in modo da minimizzare eventuali effetti dovuti alla posizione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni.

1.4.1.4 *Preparazione delle dosi*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è ammissibile.

1.4.2 **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1 *Solvente/mezzo disperdente*

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.

1.4.2.2 *Controlli*

Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente/mezzo disperdente). Gli animali dei vari gruppi dovranno essere trattati in modo identico, salvo per la somministrazione della sostanza in esame.

I controlli positivi dovrebbero produrre aberrazioni strutturali in vivo negli spermatozoni a livelli di esposizione ai quali è previsto un aumento rilevabile rispetto alla media.

Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. È ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa dalla sostanza in esame e che il campionamento venga effettuato una sola volta. È anche ammissibile l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata, se ne esistono. Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Sostanza	No. CAS	No. EINECS
Ciclofosfamide	50-18-0	200-015-4
Ciclofosfamide monoidrato	6055-19-2	
Cicloesilammina	108-91-8	203-629-0
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Acrilammide monomeric	79-06-1	201-173-7
Trietilenmelammina	51-18-3	200-083-5

In ogni fase del campionamento si proceda a controlli negativi, cui sia somministrato solo il solvente o il mezzo disperdente, senza altre differenze di trattamento, salvo che dati precedenti dimostrino che la variabilità intraspecifica e la frequenza di cellule con aberrazioni cromosomiche sono accettabili. Si ricorra anche a controlli negativi non trattati, salvo che risultati di test precedenti o dati citati in letteratura dimostrino che il solvente/mezzo disperdente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

1.5 PROCEDURA

1.5.1 Numero degli animali

Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 5 maschi analizzabili.

1.5.2 Protocollo di trattamento

Le sostanze in esame sono somministrate di preferenza in un'unica presa, o in due prese. Possono essere somministrate anche in prese frazionate, per esempio in due prese nello stesso giorno, a distanza di qualche ora al massimo, per agevolare la somministrazione, trattandosi di un prodotto di grande volume. Se si usa una posologia diversa, se ne fornisca la motivazione scientifica.

Dopo il trattamento si proceda al prelievo di due campioni nel gruppo cui è stata somministrata la dose massima. Poiché la cinetica del ciclo cellulare può essere influenzata dalla sostanza in esame, si effettuino un campionamento precoce e uno tardivo, rispettivamente 24 e 48 ore dopo il trattamento. Per dosi diverse dalla dose massima è opportuno procedere al prelievo 24 ore dopo il trattamento, o dopo un periodo pari a 1,5 volte la durata del ciclo cellulare, salvo sia noto che un campionamento in un momento diverso è più idoneo a identificare l'effetto ricercato (6).

Si possono effettuare ulteriori prelievi. Per esempio, per sostanze chimiche che possono indurre perdita di cromosomi o che possono esercitare effetti indipendenti dalla fase S, può essere opportuno effettuare un campionamento più precoce (1).

L'opportunità di un protocollo di trattamento ripetuto deve essere valutata caso per caso. Dopo un protocollo ripetuto gli animali devono essere sacrificati 24 ore (1,5 volte la durata del ciclo cellulare) dopo l'ultima somministrazione. Si possono usare fasi di campionamento addizionali, se opportuno.

Prima di sacrificare gli animali si inietti per via interperitoneale una dose adeguata di un inibitore della metafase (p.es. Colcemid[®] o colchicina). Gli animali saranno quindi sacrificati dopo un adeguato lasso di tempo. Per i topi si tratterà di circa 3-5 ore; per i criceti cinesi di circa 4-5 ore.

1.5.3 Dosi

Se si procede al uno studio del range, non essendo disponibili dati utili in materia, questo va eseguito nello stesso laboratorio, sulla stessa specie e ceppo, con il medesimo protocollo usato nel test principale (7). In caso di tossicità si usino per la prima fase di campionamento tre dosi diverse, che vadano dalla tossicità massima ad una tossicità assente o modica. Per il campionamento successivo si usi solo la dose massima. La dose massima è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali.

Sostanze con azione biologica specifica, non tossiche a dosi basse (come ormoni e mitogeni) possono costituire eccezione rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. La dose massima può essere definita anche come dose che produce qualche segno di tossicità negli spermatogoni (p.es. una riduzione del coefficiente mitotico alla prima e alla seconda metafase meiotica; tale diminuzione non dovrebbe essere superiore al 50%).

1.5.4 **Test con dose limite**

Se la somministrazione di una quantità di sostanza pari ad almeno 2000 mg per kg di peso corporeo in presa unica o in due prese nello stesso giorno non produce effetti tossici rilevabili, e se non vi sono ragioni di sospettare un'azione genotossica sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente correlate, si può considerare che non è necessario procedere alla sperimentazione completa con tre dosi diverse. Se si prevede la possibilità che esseri umani siano esposti alla sostanza in esame, può essere necessario usare una dose più elevata nel test con dose limite.

1.5.5 **Somministrazione**

La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione, oppure mediante iniezione intraperitoneale. Possono essere accettate altre vie se esiste una valida ragione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio; non deve superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi più elevati deve essere motivato. Salvo per sostanze irritanti o corrosive, che di norma riveleranno effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, le variazioni di volume devono essere minimizzate, regolando la concentrazione in modo da garantire un volume costante a tutte le dosi.

1.5.6 **Preparazione dei cromosomi**

Le sospensioni cellulari ottenute da uno o da entrambi i testicoli immediatamente dopo che l'animale è stato sacrificato sono esposte ad una soluzione ipotonica e fissate. Le cellule sono poi spalmate su vetrini e sottoposte a un processo di colorazione.

1.5.7 **Analisi**

Per ogni animale si analizzino almeno 100 cellule in metafase correttamente spalmate (cioè almeno 500 metafasi per gruppo). Tale numero può essere ridotto se si osservano numerose aberrazioni. Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio. Poiché le procedure di fissaggio dei vetrini causano spesso la rottura di una parte delle cellule in metafase con perdita di cromosomi, le cellule esaminate devono contenere un numero di centromeri pari a $2n \pm 2$.

2. **RISULTATI**

2.1 **TRATTAMENTO DEI RISULTATI**

I dati relativi ai singoli animali vanno presentati in forma di tabelle. L'unità sperimentale è l'animale. Per ciascun animale si valuti la percentuale di cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali e il numero di aberrazioni per cellula. I vari tipi di aberrazioni cromosomiche strutturali, il loro numero e la loro frequenza devono essere indicati per i gruppi di trattamento e di controllo. I salti devono essere registrati separatamente e indicati nella relazione, ma non vanno di norma inclusi nella frequenza totale delle aberrazioni.

Se si osservano tanto mitosi che meiosi, al fine di stabilire un eventuale effetto citotossico si determini il rapporto fra le mitosi degli spermatogoni e la prima e seconda metafase meiotica per tutti gli animali trattati e per i controlli negativi, su un campione totale di 100 cellule allo stadio della divisione per animale. Se si osservano solo mitosi, si determini il coefficiente mitotico in almeno 1000 cellule per animale.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, per esempio un aumento del numero relativo di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche, correlato alla dose somministrata, o un palese aumento del numero di cellule con aberrazioni nei campioni, prelevati alla stessa fase di campionamento e provenienti da un gruppo cui è stata somministrata la stessa dose della sostanza in esame. Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (8), ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico fattore determinante di una risposta positiva. Eventuali risultati ambigui possono essere chiariti mediante test ulteriori, preferibilmente in condizioni di esperimento modificate.

Una sostanza che fornisca risultati non corrispondenti ai criteri di cui sopra è considerata non mutagena in questo test.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio in vivo di aberrazione cromosomica negli spermatozoi indicano che una sostanza induce aberrazioni cromosomiche nelle cellule germinali della specie sottoposta a test. Risultati negativi indicano che nelle condizioni del test la sostanza in esame non induce aberrazioni cromosomiche nelle cellule germinali della specie sottoposta a test.

Si vagliano le probabilità che la sostanza in esame o i suoi metaboliti raggiungano specificamente il tessuto bersaglio

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve contenere le seguenti informazioni:

Solvente/Mezzo disperdente

- motivazione della scelta del mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;

Animali da laboratorio:

- specie/ceppo usati;
- numero ed età degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;
- peso dei singoli animali all'inizio del test, con range, media e deviazione standard per ciascun gruppo;

Condizioni di esperimento:

- range, se effettuato;
- criteri di selezione delle dosi;
- criteri di selezione della via di somministrazione;
- illustrazione particolareggiata della preparazione della sostanza in esame;
- illustrazione particolareggiata della somministrazione della sostanza in esame;
- criteri di determinazione del momento del sacrificio;
- conversione della concentrazione (ppm) della sostanza in esame nel cibo o nell'acqua potabile nella dose di cellule analizzate per animale;
- effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno), se del caso;
- dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua;
- descrizione dettagliata dei protocolli di trattamento e campionamento;
- metodi di misura della tossicità;
- natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata del trattamento;
- metodi di preparazione dei vetrini;
- criteri di conteggio delle aberrazioni;
- numero criteri in base ai quali i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

- segni di tossicità;
- coefficiente mitotico;
- tasso di mitosi degli spermatogoni in rapporto alla prima e seconda metafase meiotica;
- tipo e numero delle aberrazioni, indicati separatamente per ciascun animale;
- numero totale delle aberrazioni per gruppo;
- numero di cellule con aberrazioni per gruppo;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- eventuali analisi statistiche;
- dati sui controlli negativi paralleli;
- dati sui precedenti controlli negativi con ranges, medie e deviazioni standard;
- dati sui controlli positivi paralleli.
- eventuali cambiamenti di ploidia.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

BIBLIOGRAFIA

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

B. 24
SAGGIO DELLE MACCHIE (SPOT TEST): TOPI

1. **METODO**

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principi del metodo di saggio**

Quello qui considerato è un saggio in vivo nei topi, nel quale vengono esposti alle sostanze chimiche degli embrioni in corso di sviluppo. Le cellule-bersaglio negli embrioni in corso di sviluppo sono i melanoblasti e i geni-bersaglio sono quelli che governano la pigmentazione del pelame dell'animale. Gli embrioni in corso di sviluppo sono eterozigoti per una serie di detti geni della colorazione del mantello. Una mutazione nell'allele dominante di un gene di questo tipo in un melanoblasto, o la sua perdita (tramite diversi eventi genetici) ha come risultato l'espressione del fenotipo recessivo nelle sue cellule discendenti, costituita da una macchia di colore cambiato nel mantello del topo risultante. Si riporta quindi il numero della prole con dette macchie o mutazioni, e se ne raffronta la frequenza con quella riscontrata nella prole risultante da embrioni trattati soltanto con il solvente. Il saggio delle macchie (Spot test) nei topi rivela presunte mutazioni somatiche nelle cellule fetali.

1.5. **Criteri qualitativi**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

Preparazioni

Quando ciò è possibile, le sostanze in esame vengono disciolte o poste in sospensione in soluzione salina isotonica. Le sostanze non solubili in acqua vengono disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati. Il solvente usato non deve interferire con la sostanza in esame né produrre effetti tossici. È opportuno usare preparazioni fresche della sostanza in esame.

Animali da esperimento

Si accoppiano topi del ceppo T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) con il ceppo HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) o con C57 BL (nonagouti, a/a). Possono essere usati anche altri incroci appropriati, ad esempio fra NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) e DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), a condizione che producano prole nonagouti.

Numero e sesso

Viene trattato un numero di femmine gravide sufficiente per ottenere un numero appropriato di prole sopravvissute per ciascun livello di dosaggio usato. Le dimensioni appropriate del campione sono determinate dal

numero delle macchie osservate nei topi trattati e dalla scala dei dati di controllo. Un risultato negativo è accettabile soltanto quando si siano riscontrati almeno 300 figli di femmine trattate con la dose più alta.

Controlli positivi e negativi

È opportuno che siano disponibili dati di controllo simultanei ottenuti su topi trattati soltanto con il solvente (controlli negativi). Eventuali dati storici di controllo del medesimo laboratorio possono essere messi insieme con i dati di controllo nuovi in modo da accrescere la sensibilità del saggio, a condizione che essi siano omogenei. Se non si rileva alcuna mutagenicità per la sostanza in esame, dovrebbero essere disponibili dati di controllo positivo ottenuti di recente nel medesimo laboratorio in seguito a trattamento con una sostanza della quale sono noti gli effetti di mutagenicità con questo saggio.

Vie di somministrazione

Le vie abituali di somministrazione sono l'intubazione orale e l'iniezione intraperitoneale delle femmine gravide. Nei casi in cui ciò possa essere appropriato, si fa uso anche del trattamento per inalazione o di altre vie di somministrazione.

Livelli di dose

Si fa uso di almeno due livelli di dose, con uno dei livelli che dà luogo a segni di tossicità o ad una riduzione delle proporzioni della figliata. Per le sostanze non tossiche è opportuno ricorrere all'esposizione alla dose massima praticabile.

Procedimento

Viene di norma praticato un unico trattamento nel giorno 8, 9 o 10 di gravidanza, contando come giorno 1 quello in cui si è osservato per la prima volta il tappo vaginale. Detti giorni corrispondono a 7,25, 8,25 e 9,25 giorni dopo il concepimento. Possono essere praticati trattamenti successivi nel corso di detti giorni.

Analisi

La prole viene codificata e nel periodo fra tre o quattro settimane dopo la nascita si effettua su di essa l'analisi delle macchie pigmentale. Si distinguono tre categorie di macchie:

- a) macchie bianche a distanza fino a 5 mm dalla linea ventrale mediana, che si presume derivino dall'uccisione di cellule (WMVS),
- b) macchie gialle di tipo aguti, associate con le mammelle, gli organi genitali, le zone della gola, delle ascelle e dell'inguine e la parte mediana della fronte, che si presume derivino da difettoso differenziamento (MDS),
- c) macchie pigmentate e bianche distribuite in disordine sul manto, che si presume derivino da mutazioni somatiche (RS).

Devono essere osservate tutte e tre le categorie, ma ha rilevanza genetica soltanto l'ultima, RS. Eventuali problemi per quel che riguarda la distinzione fra MDS e RS possono essere risolti mediante microscopia fluorescente di peli presi come campione.

Va presa nota di evidenti anomalie morfologiche grossolane della prole.

2. DATI

I dati vengono presentati sotto forma del numero totale dei discendenti esaminati e del numero dei discendenti che hanno una o più macchie da mutazione somatica presunta. I dati relativi ai trattamenti ed al controllo negativo vengono posti a raffronto secondo metodi statistici appropriati. I dati sono anche presentati su base per prole.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- ceppi usati nell'incrocio,
- numero di femmine gravide nei gruppi trattati e nei gruppi di controllo,
- dimensioni medie delle figliate nei gruppi trattati ed in quelli di controllo alla nascita ed allo svezzamento,
- livelli di dose della sostanza in esame,
- solvente usato,

- giorno di gravidanza al quale è stato praticato il trattamento,
- vie di somministrazione del trattamento,
- numero complessivo dei discendenti esaminati, e numero dei discendenti con WMVS, MDS e RS nei gruppi trattati e in quelli di controllo,
- anomalie morfologiche grossolane,
- relazione dose/risposte di RS quando ciò sia possibile,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 25

TRASLOCAZIONI EREDITABILI: TOPO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Il saggio delle traslocazioni ereditabili nel topo rivela cambiamenti strutturali e numerici dei cromosomi nelle cellule germinali di mammiferi quali sono recuperate nella progenie della prima generazione. I tipi di mutazioni cromosomiche sono delle traslocazioni reciproche e, se è compresa progenie femminile, la perdita del cromosoma X. I portatori di traslocazione e le femmine XO presentano fertilità ridotta e di ciò è fatto uso per la selezione di progenie F_1 per l'analisi citogenetica. Taluni tipi di traslocazioni (autosoma-X e tipo c-t) provocano sterilità completa. Le traslocazioni sono citogeneticamente osservabili in cellule meiotiche alla diacinesi della metafase I di individui di sesso maschile, che sono o maschi F_1 o figli di femmine F_1 . Le femmine XO sono identificate citogeneticamente dalla presenza di 39 cromosomi soltanto nelle mitosi del midollo osseo.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Le sostanze chimiche in esame vengono disciolte in soluzione salina isotonica. Se insolubili esse vengono disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati. È fatto uso di soluzioni della sostanza in esame preparate di fresco.

Se si fa uso di un solvente per facilitare il dosaggio, esso non deve interferire con il composto in esame né dar luogo ad effetti tossici.

Vie di somministrazione

Le vie di somministrazione sono solitamente l'intubazione orale o l'iniezione intraperitoneale. Possono essere appropriate altre vie di somministrazione.

Animali da esperimento

Per la facilità della riproduzione e della verifica citologica, gli esperimenti in questione vengono effettuati sui topi. Non è necessario alcun ceppo di topi specifico. Tuttavia, nell'effettuazione di prove riguardanti la fertilità è opportuno che le dimensioni medie della figliata del ceppo usato siano di più di 8 neonati e siano inoltre relativamente costanti. Sono usati animali sani sessualmente maturi.

Numero di animali

Il numero degli animali occorrenti dipende dalla frequenza delle traslocazioni spontanee, e dal tasso minimo di induzione necessario per un risultato positivo. Il saggio si effettua normalmente mediante analisi della progenie maschile F_1 . È opportuno esaminare almeno 500 capi di progenie maschile F_1 per ciascun gruppo/dose. Se si include progenie femminile F_1 , occorrono 300 maschi e 300 femmine.

Uso di controlli negativi e positivi

Dovrebbero essere disponibili dati adeguati di controllo, derivati da controlli simultanei o storici. Qualora siano disponibili dati accettabili di controllo positivo da esperimenti condotti di recente nello stesso laboratorio, questi risultati possono essere usati in luogo del controllo positivo simultaneo.

Livelli di dose

Si sperimenta un solo livello di dose, ossia solitamente la dose più alta associata con la produzione dei minimi effetti tossici, ma senza che sia influenzato il comportamento riproduttivo o la sopravvivenza. Per stabilire una relazione dose/risposta sono necessarie due dosi supplementari più basse. Per le sostanze non tossiche è opportuno adottare un'esposizione alla dose massima praticabile.

Procedimento

Trattamento e accoppiamento

Sono possibili due schemi di trattamento. Nello schema più largamente usato è praticata un'unica somministrazione della sostanza in esame. Si può tuttavia procedere anche all'applicazione della sostanza in esame 7 giorni per settimana per 35 giorni. Il numero degli accoppiamenti successivi al trattamento è determinato dal programma di trattamento adottato, e deve essere stabilito in modo che siano considerati tutti gli stadi delle cellule germinali trattate. Al termine del periodo di accoppiamento, le femmine vengono tenute in gabbie individuali. Quando le femmine partoriscono, si prende nota della data, del numero e del sesso della progenie. Tutta la progenie maschile viene svezzata, mentre tutta la progenie femminile viene scartata, salvo nel caso che la si includa nell'esperimento.

Controllo della eterozigosi di traslocazione

È praticato l'uno o l'altro di due metodi possibili:

- analisi della fertilità della progenie F_1 e successiva verifica degli eventuali portatori di traslocazione mediante analisi citogenetica;
- analisi citogenetica di tutta la progenie maschile F_1 senza selezione preliminare mediante analisi della fertilità.

a) Analisi della fertilità

La diminuzione della fertilità di un individuo F_1 può essere stabilita attraverso l'osservazione delle dimensioni della figliata e/o dell'analisi del contenuto uterino delle femmine accoppiate.

Devono essere stabiliti dei criteri specifici per la determinazione della fertilità normale e della fertilità diminuita nel ceppo di topi usato.

Osservazione dell'entità delle figliate: i maschi F_1 da sottoporre al saggio vengono posti in gabbia individualmente con femmine del medesimo esperimento o della colonia. Le gabbie vengono ispezionate giornalmente a partire da 18 giorni dopo l'accoppiamento. Viene presa nota alla nascita dell'entità della figliata e del sesso dalla progenie F_2 e le figliate vengono successivamente scartate. Se si sottopone al saggio la progenie femminile F_1 , si tiene la progenie F_2 di piccole figliate per un'ulteriore sperimentazione. Le portatrici femmine di traslocazioni sono verificate mediante analisi citogenetica di una traslocazione in uno qualsiasi dei loro discendenti maschi. Le femmine XO si riconoscono dal cambiamento del rapporto fra i sessi nella loro progenie (maschi/femmine da 1:1 a 1:2). In un procedimento in serie si escludono gli animali F_1 normali da sperimentazioni ulteriori se la prima figliata F_2 raggiunge o supera un valore normale predeterminato, altrimenti si osserva una seconda o una terza figliata F_2 . Gli animali F_1 che non possono essere classificati come normali dopo l'osservazione di un numero di figliate F_2 fino a tre vengono saggiati ulteriormente mediante l'analisi del contenuto uterino delle femmine con essi accoppiate, oppure sono direttamente sottoposti all'analisi citogenetica.

Analisi del contenuto uterino: la diminuzione dell'entità delle figliate nei portatori di traslocazioni è dovuta a morte dell'embrione, e di conseguenza un numero elevato di impianti morti è indicativo della presenza di una traslocazione nell'animale all'esame. I maschi F_1 da sottoporre al saggio vengono accoppiati con due, tre femmine ciascuno. Il concepimento viene determinato mediante ispezione giornaliera per l'osservazione di tappi vaginali fra le 8 e le 10 antimeridiane. Le femmine vengono uccise da 14 a 16 giorni dopo e viene presa nota degli impianti sia vivi che morti nei loro uteri.

b) Analisi citogenetica

Si allestiscono preparati di testicoli con la tecnica dell'essiccazione in aria. I portatori di traslocazioni sono identificati in base alla presenza di configurazioni multivalenti alla diacinesi di metafasi I degli spermatozoi primari. L'osservazione di almeno due cellule con associazione multivalente costituisce la prova occorrente che l'animale sottoposto al saggio è un portatore di traslocazione.

Se non si è proceduto ad alcuna selezione nell'allevamento, sono esaminati citogeneticamente tutti i maschi F_1 . Deve essere riscontrato al microscopio un minimo di 25 diacinesi metafasi I per maschio. Per i maschi F_1 con testicoli piccoli e con degradazione meiotica prima della diacinesi e per le femmine F_1 sospette di XO è necessario l'esame delle metafasi mitotiche, degli spermatogoni o del midollo osseo. La presenza di un cromosoma insolitamente lungo e/o corto in ognuna di 10 cellule è il segno di una traslocazione particolare sterile del maschio (tipo c-t). Talune traslocazioni di autosoma X che provocano la sterilità del maschio possono essere identificate soltanto raggruppando l'analisi dei cromosomi mitotici. La presenza di 39 cromosomi nella totalità di 10 mitosi è il segno di una condizione di XO in una femmina.

2. DATI

I dati sono presentati in forma di tabelle. Sono riportati l'entità media delle figliate e il rapporto fra i sessi dagli accoppiamenti dei genitori alla nascita e allo svezzamento per ciascun intervallo di accoppiamento.

Per la valutazione della fertilità degli animali F_1 sono presentate le entità medie delle figliate di tutti gli accoppiamenti normali e le entità delle figliate singole dei portatori di traslocazioni F_1 . Per l'analisi del contenuto uterino è dato ragguglio del numero medio degli impianti vivi e morti degli accoppiamenti normali e del numero individuale degli impianti vivi e morti per ciascun accoppiamento di portatori di traslocazione F_1 .

Per l'analisi citogenetica della diacinesi metafase I sono elencati per ciascun portatore di traslocazione il numero di tipi di configurazioni multivalenti ed il numero totale delle cellule.

Per gli individui F_1 sterili sono riportati il numero totale degli accoppiamenti e la durata del periodo di accoppiamento. Sono forniti i pesi dei testicoli e dettagli delle analisi citogenetiche.

Per le femmine XO sono riportati l'entità media delle figliate, il rapporto fra i sessi della progenie F_2 e i risultati dell'analisi citogenetica.

Se possibile i portatori di traslocazioni vengono preselezionati per mezzo di analisi della fertilità; le tabelle devono in tal caso recare l'indicazione del numero di soggetti così selezionati che sono risultati eterozigoti di traslocazione confermati.

Sono parimenti riportati i dati dei controlli negativi e degli esperimenti di controllo positivo.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- ceppo dei topi, età degli animali, pesi degli animali trattati,
- numero di animali genitori dell'uno e dell'altro sesso nei gruppi sottoposti al saggio e nei gruppi di controllo,
- condizioni di effettuazione del saggio, descrizione particolareggiata del trattamento, livelli di dosaggio, solventi, programmi di accoppiamento,
- numero e sesso dei piccoli nati per femmina, numero e sesso dei piccoli allevati per l'analisi della traslocazione,
- tempo e criteri dell'analisi della traslocazione,
- numero e descrizione particolareggiata dei portatori di traslocazioni ivi compresi i dati riguardanti la procreazione e i dati sul contenuto uterino, se del caso,
- procedimenti citogenetici e dettagli delle analisi microscopiche, di preferenza con illustrazioni,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B.26. TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA

STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI RODITORI

1. METODO

Questo metodo di tossicità subcronica corrisponde al TG 408 (1998) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Nella valutazione e nel giudizio delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale subcronica con dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante test di tossicità acuta o con dosi ripetute per 28 giorni. Lo studio di 90 giorni fornisce informazioni sui possibili rischi per la salute che potrebbero derivare dall'esposizione ripetuta per un periodo di tempo prolungato che copre la maturazione post-svezzamento e la crescita, fino all'età adulta. Con questo studio si otterranno dati sui principali effetti tossici, sugli organi bersaglio e sulla possibilità di accumulo, mediante i quali si potrà stimare il livello di esposizione al quale non si osservano effetti avversi, che può essere utilizzato per scegliere i livelli delle dosi per gli studi cronici e per definire i criteri di sicurezza relativi all'esposizione di soggetti umani.

Il metodo pone ulteriore enfasi sugli endpoint neurologici e fornisce un'indicazione degli effetti immunologici e riproduttivi. Si sottolinea inoltre la necessità di sottoporre gli animali ad attente osservazioni cliniche, allo scopo di ottenere il maggior numero possibile di informazioni. Il presente studio dovrebbe permettere l'identificazione di sostanze chimiche che abbiano la capacità potenziale di provocare effetti neurotossici, o sul sistema immunologico o sugli organi della riproduzione che potrebbero richiedere ulteriori indagini approfondite.

Vedi anche Introduzione generale Parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Dose: quantità della sostanza di prova somministrata. La dose si esprime in termini di peso (g, mg) o di peso della sostanza in esame per unità di peso dell'animale sperimentale (ad esempio mg/kg), oppure in termini di concentrazioni dietetiche costanti (ppm).

Dosaggio: termine generico che comprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

NOAEL: abbreviazione di "no-observed-adverse-effect level" (livello al quale non si osservano effetti dannosi): il più alto livello di dose a cui non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Ogni giorno, per un periodo di 90 giorni, si somministra per via orale la sostanza in esame in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento, laddove ad ogni gruppo corrisponde un determinato livello di dose. Durante il periodo di somministrazione si tengono gli animali sotto attenta osservazione per individuare eventuali segni di tossicità. Gli animali che muoiono o vengono sacrificati durante il test sono sottoposti a esame necroscopico e, a conclusione del test, anche gli animali sopravvissuti vengono sacrificati e sottoposti a esame necroscopico.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.4.1 **Preparazione degli animali**

Si utilizzano solo animali sani che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni e non siano stati sottoposti a precedenti procedure sperimentali. Gli animali in esame vanno caratterizzati per specie, ceppo, origine, sesso, peso e/o età. L'assegnazione degli animali al gruppo di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. Le gabbie vanno disposte in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla collocazione. A ogni animale deve essere assegnato un numero di identificazione esclusivo.

1.4.2 **Preparazione delle dosi**

La sostanza di prova viene somministrata mediante sonda gastrica, oppure con la dieta o l'acqua di abbeveraggio. Il metodo di somministrazione orale dipende dallo scopo dello studio e dalle caratteristiche fisico-chimiche del materiale da esaminare.

Se necessario, la sostanza di prova viene disciolta o posta in sospensione in un veicolo adeguato. Dove possibile, si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione la possibilità di utilizzare una soluzione/sospensione acquosa, indi una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di mais) e infine una soluzione in altri veicoli. Se si usano veicoli diversi dall'acqua è necessario conoscerne le caratteristiche tossiche. Occorre inoltre determinare la stabilità della sostanza di prova nelle condizioni di somministrazione.

1.4.3 **Condizioni di esecuzione del test**

1.4.3.1 *Animali sperimentali*

La specie di elezione è il ratto, sebbene si possano utilizzare anche altre specie di roditori, come il topo. È bene usare ceppi di animali giovani adulti sani comunemente utilizzati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. La somministrazione dovrebbe iniziare al più presto possibile dopo lo svezzamento e comunque prima che gli animali abbiano raggiunto le nove settimane di vita. All'inizio dello studio la variazione di peso degli animali deve essere minima e non superare il $\pm 20\%$ del peso medio per ciascun sesso. Per gli studi preliminari a studi della tossicità cronica a lungo termine, è necessario usare animali dello stesso ceppo e provenienti dalla stessa origine in entrambi gli studi.

1.4.3.2 *Numero e sesso*

Per ciascun livello di dose vanno usati almeno 20 animali (dieci femmine e dieci maschi). Qualora si preveda di sacrificare a intervalli intermedi alcuni animali, il numero iniziale va aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. In base alle precedenti conoscenze sulla sostanza chimica o su una sostanza analoga, occorre valutare la possibilità di includere un ulteriore gruppo satellite di dieci animali (cinque per sesso) nel gruppo di controllo e in quello trattato col livello di dose più elevato, allo scopo di osservare, dopo il periodo di trattamento, la reversibilità o la persistenza di eventuali effetti tossici. La durata di tale periodo post-trattamento va stabilita adeguatamente tenendo conto degli effetti osservati.

1.4.3.3 *Livelli di dose*

Occorre utilizzare almeno tre livelli di dose e un controllo concomitante, tranne quando si esegue un test limite (vedi 1.4.3.4). I livelli di dose possono essere basati sui risultati di precedenti studi con dosi ripetute o di definizione del range e devono tenere conto dei dati tossicologici e tossicocinetici esistenti relativi alla sostanza in esame o a materiali analoghi. A meno che non sia limitato dalla natura fisico-chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato va scelto con l'obiettivo di indurre tossicità, senza provocare il decesso o gravi sofferenze agli animali. Occorre scegliere una sequenza decrescente dei livelli di dose per poter eventualmente dimostrare la correlazione dosaggio/risposta e un NOAEL al livello di dose più basso. In genere, per definire i livelli decrescenti di dose si consiglia l'impiego di intervalli multipli di un numero compreso fra due e quattro e, spesso, l'aggiunta di un quarto gruppo sperimentale è preferibile all'uso di intervalli molto ampi (ad esempio, più di un fattore di circa 6-10) fra i dosaggi.

Il gruppo di controllo deve essere non trattato oppure, se per somministrare la sostanza di prova si impiega un veicolo, trattato solo con il veicolo. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo deve riceverne il volume più elevato somministrato. Se la sostanza di prova viene somministrata con la dieta e concorre a ridurre l'assunzione di cibo da parte degli animali, per distinguere fra la riduzione dovuta a questo fatto e quella determinata dalle alterazioni tossicologiche può essere utile un gruppo di controllo *pair-fed*.

Occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del veicolo e di eventuali altri additivi: effetti su assorbimento, distribuzione, metabolismo o ritenzione della sostanza di prova; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di prova che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali.

1.4.3.4 *Test limite*

Se, impiegando la procedura descritta per il presente studio, un test a un livello di dose equivalente ad almeno 1000 mg/kg di peso corporeo/die non produce effetti avversi e se, sulla base dei dati relativi a sostanze strutturalmente affini non si prevede tossicità, ci si può esimere dal condurre uno studio completo con tre livelli di dose. Il test limite non si applica quando l'esposizione di soggetti umani indica la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

1.5 PROCEDURA

1.5.1 **Somministrazione delle dosi**

Le dosi della sostanza in esame devono essere somministrate quotidianamente, sette giorni alla settimana, per 90 giorni. Occorre giustificare la scelta di eventuali altri regimi di dosaggio (ad es. cinque giorni alla settimana). Se si utilizza una sonda gastrica o una cannula per intubazione, la somministrazione deve avvenire in dose unica. Il volume massimo di liquido somministrabile ogni volta dipende dalle dimensioni dell'animale sperimentale, ma non deve superare 1 ml/100g di peso corporeo, tranne in caso di soluzioni acquose per le quali si possono usare 2 ml/100g di peso corporeo. Ad eccezione delle sostanze irritanti o corrosive, che in genere producono effetti più forti a concentrazioni più elevate, occorre ridurre al minimo la variabilità del volume da somministrare regolando la concentrazione in modo da mantenere il volume costante a tutti i livelli di dose.

Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua di abbeveraggio è importante impedire che la quantità della sostanza in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Quando la sostanza in esame viene somministrata nella dieta si possono usare sia una concentrazione dietetica costante (ppm), sia un livello di dose costante in termini di peso corporeo dell'animale ed occorre motivare l'opzione scelta. Se si utilizza invece l'alimentazione forzata con sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno più o meno alla stessa ora, regolandola adeguatamente per mantenere la dose a un livello costante rispetto al peso corporeo dell'animale. Se lo studio sul periodo di 90 giorni è preliminare ad uno studio sulla tossicità cronica a lungo termine, occorre utilizzare una dieta simile in entrambi.

1.5.2 Osservazioni

Il periodo di osservazione deve essere di almeno 90 giorni. Gli animali del gruppo satellite destinato a osservazioni di follow-up non vanno trattati per un periodo adeguato, allo scopo di individuare la persistenza o la remissione degli effetti tossici.

Le osservazioni cliniche vanno effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla/e stessa/e ora/e, tenendo conto del periodo di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione. Occorre registrare le condizioni cliniche degli animali. Per identificare segni di morbilità e mortalità tutti gli animali vanno osservati almeno due volte al giorno, in genere all'inizio e alla fine della giornata.

Tutti gli animali vanno sottoposti a dettagliate osservazioni cliniche almeno una volta prima della prima esposizione (per consentire il confronto all'interno dei gruppi di soggetti) e, successivamente, una volta alla settimana. Le osservazioni vanno eseguite fuori dalla gabbia di stabulazione, preferibilmente in un ambiente standard e sempre all'incirca allo stesso orario. Occorre registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti appositamente dal laboratorio che esegue l'esperimento. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di osservazione. I segni da osservare sono almeno i seguenti: cambiamenti a livello cutaneo, del pelo, degli occhi e delle mucose, presenza di secrezioni ed escrezioni e attività neurovegetativa (ad esempio lacrimazione, piloerezione, reazioni pupillari, alterazioni della respirazione). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti tonici o clonici, stereotipie (ad esempio tendenza a pulirsi eccessivamente, a girare in cerchio) e comportamenti insoliti (ad esempio automutilazione, deambulazione a ritroso) (1).

Prima della somministrazione della sostanza in esame e a conclusione dello studio occorre eseguire un esame oftalmologico, mediante un oftalmoscopio o analogo dispositivo idoneo, preferibilmente su tutti gli animali o comunque almeno sul gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata e sui controlli. Se si riscontrano alterazioni degli occhi è necessario esaminare tutti gli animali.

Verso la fine del periodo di esposizione e comunque non prima della 11^a settimana si valutano i seguenti parametri: reattività sensoriale a stimoli di vario tipo (1) (ad esempio stimoli uditivi, visivi e propriocettivi) (2), (3), (4), forza di presa (5) e attività motoria (6). Ulteriori particolari sulle procedure ammesse si trovano nei rispettivi riferimenti bibliografici, ma sono comunque accettabili procedure alternative.

Le osservazioni funzionali da effettuare verso la fine dello studio possono essere omesse se sono disponibili dati a questo riguardo derivati da altri studi e se le osservazioni cliniche quotidiane non hanno rivelato deficit funzionali.

Eccezionalmente è possibile omettere le osservazioni funzionali anche per i gruppi che evidenzino comunque segni di tossicità tale da interferire in modo significativo con l'esecuzione dei test di funzionalità.

1.5.2.1 *Peso corporeo e assunzione di cibo/acqua*

Tutti gli animali vanno pesati almeno una volta alla settimana. La misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua di abbeveraggio, anche il consumo di acqua va misurato almeno a cadenza settimanale. È utile tener conto del consumo di acqua anche negli studi con somministrazione mediante dieta o sonda gastrica perché potrebbe risultare alterato.

1.5.2.2 *Ematologia e biochimica clinica*

Occorre prelevare campioni di sangue da un sito specifico e conservarli, se opportuno, in condizioni adeguate. Alla fine del test si raccolgono campioni di sangue subito prima o nel corso della procedura di soppressione degli animali.

I seguenti esami ematologici vanno eseguiti sui campioni prelevati alla fine e nel corso del test: ematocrito, concentrazione di emoglobina, conta degli eritrociti, conta totale e differenziale dei leucociti, conta delle piastrine e misurazione del potenziale di coagulazione (tempo).

Le determinazioni di biochimica clinica per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, più specificatamente, degli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati da ciascun animale subito prima o nel corso della procedura di soppressione degli animali (salvo gli esemplari moribondi e/o sacrificati nel frattempo). Analogamente agli esami ematologici, si possono raccogliere campioni di sangue a intervalli intermedi per eseguire test di biochimica clinica. Si raccomanda di lasciare gli animali a digiuno la notte precedente la raccolta dei campioni¹. Le determinazioni, nel plasma o nel siero, devono comprendere sodio, potassio, glucosio, colesterolo totale, urea, azoto ureico, creatinina, proteine totali e albumina, ed almeno tre enzimi indicativi degli effetti epatocellulari (ad es. alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, fosfatasi alcalina, gamma-glutamyl-transpeptidasi e deidrogenasi del sorbitolo). Possono essere aggiunte anche misurazioni di altri enzimi (epatici o di altra origine) e degli acidi biliari, che in alcune circostanze possono fornire utili informazioni.

A scelta, nel corso dell'ultima settimana di studio, è possibile eseguire le seguenti analisi delle urine, raccolte in tempi prestabiliti: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche.

È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sui marker sierologici dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni da eseguire se le proprietà note della sostanza possono, o si sospetta che possano, influire sui profili metabolici sono calcio, fosforo, trigliceridi a digiuno, ormoni specifici, metaemoglobina e colinesterasi. Queste determinazioni vanno effettuate per alcune classi di sostanze chimiche oppure caso per caso.

Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile in funzione delle specie e dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza.

Non disponendo di sufficienti dati pregressi occorre valutare se sia necessario determinare le variabili ematologiche e di biochimica clinica prima della somministrazione; in generale non è raccomandabile che tali dati siano generati prima del trattamento (7).

(1) Per svariate misurazioni del siero e del plasma, e soprattutto per il glucosio, sarebbe preferibile mantenere il digiuno per tutta la notte. Il motivo principale è che l'aumento della variabilità dovuto inevitabilmente al mancato digiuno tenderebbe a mascherare effetti meno evidenti rendendo più difficile l'interpretazione. D'altro lato, però, il digiuno notturno può interferire con il metabolismo generale degli animali e, soprattutto negli studi sull'alimentazione, può incidere sull'esposizione quotidiana alla sostanza in esame. Se si adotta il digiuno notturno le osservazioni biochimiche cliniche vanno eseguite dopo le osservazioni funzionali.

1.5.2.3 *Necropsia macroscopica*

Tutti gli animali dello studio vanno sottoposti a completa e dettagliata necropsia macroscopica che comprende un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Fegato, reni, ghiandole surrenali, testicoli, epididimi, utero, ovaie, timo, milza, cervello e cuore di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati nel frattempo) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento.

I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più adatto, sia per il tipo di tessuto, sia per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare: tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto, bulbo e/o ponte), midollo spinale (a tre livelli: cervicale, mediotoracico e lombare), ghiandola pituitaria, tiroide, paratiroide, timo, esofago, ghiandole salivari, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, pancreas, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, trachea e polmoni (conservati con dilatazione e poi immersione in fissativo), aorta, gonadi, utero, annessi, ghiandola mammaria delle femmine, prostata, vescica, cistifellea (topo), linfonodi (preferibilmente un linfonodo interessato dalla via di somministrazione e un altro distante dalla via di somministrazione per coprire gli effetti sistemici), un nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, una sezione di midollo osseo (e/o un aspirato di midollo osseo fresco), cute e occhi (se gli esami oftalmologici hanno evidenziato alterazioni). I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

1.5.2.4 *Esame istopatologico*

Gli organi e i tessuti conservati di tutti gli animali del gruppo di controllo e del gruppo che riceve la dose più elevata vanno sottoposti a esame istopatologico completo. Si procede a questi esami anche sugli animali degli altri gruppi se nel gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento.

Vanno esaminate tutte le lesioni macroscopiche.

Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1 **DATI**

I dati devono essere forniti separatamente per ogni soggetto. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo sperimentale il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante il test o sacrificati per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi o soppressioni, il numero di animali che presentano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, quali momento dell'esordio, durata e gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali rapportata al tipo di lesione.

I risultati numerici vanno valutati mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettabile. I metodi statistici e i dati da analizzare vanno scelti già in sede di determinazione del disegno sperimentale.

2.2 RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

2.2.1 **Sostanza di prova:**

- natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche;
- dati identificativi;
- veicolo (se utilizzato): motivazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

2.2.2 **Specie di prova:**

- specie e ceppo usati;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;
- peso dei singoli animali all'inizio del test.

2.2.3 **Condizioni di esecuzione del test:**

- motivo della scelta del livello di dose;
- dettagli sulla formulazione della sostanza in esame/preparazione dietetica, sulla concentrazione ottenuta, sulla stabilità e l'omogeneità della preparazione;
- dettagli sulla somministrazione della sostanza in esame;
- dosi effettive (mg/kg di peso corporeo/die) e fattore di conversione dalla concentrazione della sostanza di prova nella dieta/acqua di abbeveraggio (ppm) alla dose effettiva, se del caso;
- particolari sulla qualità del cibo e dell'acqua.

2.2.4 **Risultati:**

- peso corporeo e cambiamenti del peso corporeo;
- assunzione di cibo ed eventualmente di acqua;
- dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, compresi i segni di tossicità;
- natura, gravità e durata delle osservazioni cliniche (reversibili o meno);
- risultati dell'esame oftalmologico;
- valutazioni di attività sensoriale, forza di presa e attività motoria (se disponibili);
- test ematologici con i relativi valori basali;
- test biochimici clinici con i relativi valori basali;
- peso corporeo terminale, peso degli organi e rapporti tra peso degli organi e peso corporeo;
- risultati della necropsopia;
- descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici;
- dati sull'assorbimento, se disponibili;
- elaborazione statistica dei risultati, se del caso;

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

3. **BIBLIOGRAFIA**

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
- (3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
- (4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxivol.*, 1, 233-236.
- (6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599-609.
- (7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, 198-201.

B.27. TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA

STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI NON RODITORI

1. METODO

Questo metodo di tossicità orale subcronica corrisponde al TG 409 (1998) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Nella valutazione e nel giudizio delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale subcronica con dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante test di tossicità acuta o con dosi ripetute per 28 giorni. Lo studio di 90 giorni fornisce informazioni sui possibili rischi per la salute che potrebbero derivare dall'esposizione ripetuta in un periodo di rapida crescita, fino alla giovane età adulta. Con questo studio si otterranno dati sui principali effetti tossici, sugli organi bersaglio e sulla possibilità di accumulo, mediante i quali si potrà stimare il livello di esposizione al quale non si osservano effetti avversi che può essere utilizzato per scegliere i livelli delle dosi per gli studi cronici e per definire i criteri di sicurezza relativi all'esposizione di soggetti umani.

Il metodo di test consente di identificare gli effetti avversi dell'esposizione a sostanze chimiche in specie di non roditori e va usato solo:

- nei casi in cui gli effetti osservati in altri studi indichino la necessità di procedere ad un chiarimento o ad una caratterizzazione in un secondo test su specie di non roditori, oppure
- nei casi in cui gli studi tossicocinetici indichino che sia meglio utilizzare una particolare specie di non roditori, oppure
- nei casi in cui altri motivi specifici giustifichino l'uso di una specie di non roditori.

Vedi anche Introduzione generale Parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Dose: quantità della sostanza di prova somministrata. La dose si esprime in termini di peso (g, mg) o di peso della sostanza in esame per unità di peso dell'animale sperimentale (ad esempio mg/kg), oppure in termini di concentrazioni dietetiche costanti (ppm).

Dosaggio: termine generico che comprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

NOAEL: abbreviazione di "no-observed-adverse-effect level" (livello al quale non si osservano effetti dannosi): il più alto livello di dose a cui non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Ogni giorno, per un periodo di 90 giorni, si somministra per via orale la sostanza in esame in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento, laddove ad ogni gruppo corrisponde un determinato livello di dose. Durante il periodo di somministrazione si tengono gli animali sotto attenta osservazione per individuare eventuali segni di tossicità. Gli animali che muoiono o vengono sacrificati durante il test sono sottoposti a esame necroscopico e, a conclusione del test, anche gli animali sopravvissuti vengono sacrificati e sottoposti a esame necroscopico.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.4.1 **Selezione delle specie di animali**

La specie di non roditori comunemente utilizzata è il cane, preferibilmente di razza definita; spesso si utilizza la razza beagle. È possibile utilizzare anche altre specie, come il maiale, il mini-pig ed altri. Si raccomanda di non utilizzare primati, la cui scelta va motivata. Si utilizzano animali giovani e sani e, nel caso del cane, la somministrazione deve iniziare preferibilmente a 4-6 mesi e comunque entro il 9° mese di vita. Per gli studi preliminari a studi della tossicità cronica a lungo termine, è necessario usare la stessa specie o la stessa razza in entrambi gli studi.

1.4.2 **Preparazione degli animali**

Si utilizzano solo animali sani e giovani che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio e non siano stati sottoposti a precedenti procedure sperimentali. La durata dell'acclimatazione dipende dalla specie selezionata per il test e dalla sua origine. Si raccomanda un periodo di almeno 5 giorni per cani o maiali di una colonia residente allevati a scopo sperimentale, e di almeno 2 settimane per gli stessi animali provenienti da fonti esterne. Gli animali sperimentali vanno caratterizzati per specie, ceppo, origine, sesso, peso e/o età. L'assegnazione degli animali al gruppo di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. Le gabbie vanno disposte in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. A ogni animale deve essere assegnato un numero di identificazione esclusivo.

1.4.3 **Preparazione delle dosi**

La sostanza in esame può essere somministrata nella dieta o nell'acqua di abbeveraggio, mediante sonda gastrica o in capsule. Il metodo di somministrazione orale dipende dallo scopo dello studio e dalle caratteristiche fisico-chimiche del materiale in esame.

Se necessario, la sostanza di prova viene disciolta o posta in sospensione in un veicolo adeguato. Dove possibile, si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione la possibilità di utilizzare una soluzione/sospensione acquosa, indi una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di mais) e infine una soluzione in altri veicoli. Se si usano veicoli diversi dall'acqua è necessario conoscerne le caratteristiche tossiche. Occorre determinare inoltre la stabilità della sostanza di prova nelle condizioni di somministrazione.

1.5 PROCEDURA

1.5.1 **Numero e sesso degli animali**

Per ciascun livello di dose vanno usati almeno otto animali (quattro femmine e quattro maschi). Qualora si preveda di sacrificare a intervalli intermedi alcuni animali, il numero va aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Il numero di animali al termine dello studio deve essere tale da consentire di effettuare una valutazione significativa degli effetti tossici. In base alle precedenti conoscenze sulla sostanza chimica o su una sostanza analoga, occorre valutare la possibilità di includere un ulteriore gruppo satellite di otto animali (quattro per sesso) nel gruppo di controllo e in quello trattato col livello di dose più elevato, allo scopo di osservare, dopo il periodo di trattamento, la reversibilità o la persistenza di eventuali effetti tossici. La durata di tale periodo post-trattamento va stabilita adeguatamente tenendo conto degli effetti osservati.

1.5.2 **Dosaggio**

Occorre utilizzare almeno tre livelli di dose e un controllo concomitante, tranne quando si esegue un test limite (vedi 1.5.3). I livelli di dose possono essere basati sui risultati di precedenti studi con dosi ripetute o di definizione del range e devono tenere conto dei dati tossicologici e tossicocinetici esistenti disponibili relativi al composto in esame o a materiali analoghi. A meno che non sia limitato dalla natura fisico-chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato va scelto con l'obiettivo di indurre tossicità, senza provocare il decesso o arrecare gravi sofferenze. Occorre scegliere una sequenza decrescente dei livelli di dose per poter eventualmente dimostrare la correlazione dosaggio/risposta e un NOAEL al livello di dose più basso. In genere, per definire i livelli decrescenti di dose è ottimale l'impiego di intervalli multipli di un numero compreso fra due e quattro e, spesso, l'aggiunta di un quarto gruppo sperimentale è preferibile all'uso di intervalli molto ampi (ad esempio, più di un fattore di circa 6-10) fra i dosaggi.

Il gruppo di controllo deve essere non trattato oppure, se per somministrare la sostanza di prova si impiega un veicolo, trattato solo con il veicolo. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo deve riceverne il volume più elevato somministrato. Se la sostanza di prova viene somministrata con la dieta e concorre a ridurre l'assunzione di cibo da parte degli animali, per distinguere fra la riduzione dovuta a questo fatto e quella determinata dalle alterazioni tossicologiche può essere utile un gruppo di controllo *pair-fed*.

Occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del veicolo e di eventuali altri additivi: effetti su assorbimento, distribuzione, metabolismo o ritenzione della sostanza di prova; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di prova che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali.

1.5.3 **Test limite**

Se, impiegando la procedura descritta per il presente studio, un test a un livello di dose equivalente ad almeno 1000 mg/kg di peso corporeo/die non produce effetti avversi e se, sulla base dei dati relativi a sostanze strutturalmente affini, non si prevede tossicità, ci si può esimere dal condurre uno studio completo con tre livelli di dose. Il test limite non si applica quando l'esposizione di soggetti umani indica la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

1.5.4 **Somministrazione delle dosi**

Le dosi della sostanza in esame devono essere amministrate quotidianamente, sette giorni alla settimana, per 90 giorni. Occorre giustificare la scelta di eventuali altri regimi di dosaggio (ad esempio cinque giorni alla settimana). Se si utilizza una sonda gastrica o una cannula per intubazione, la somministrazione deve avvenire in dose unica. Il volume massimo di liquido somministrabile ogni volta dipende dalle dimensioni dell'animale sperimentale e di norma va mantenuto al minimo possibile. Ad eccezione delle sostanze irritanti o corrosive, che in genere producono effetti più forti a concentrazioni più elevate, occorre ridurre al minimo la variabilità del volume da somministrare regolando la concentrazione in modo da mantenere il volume costante a tutti i livelli di dose.

Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua di abbeveraggio è importante impedire che le quantità della sostanza in esame interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Quando la sostanza in esame viene somministrata nella dieta si possono usare sia una concentrazione dietetica costante (ppm), sia un livello di dose costante in termini di peso corporeo dell'animale ed occorre motivare l'opzione scelta. Se si utilizza invece l'alimentazione forzata mediante sonda gastrica o se si somministrano capsule, la dose va somministrata ogni giorno più o meno alla stessa ora, regolandola adeguatamente per mantenere la dose a un livello costante rispetto al peso corporeo dell'animale. Se lo studio sul periodo di 90 giorni è preliminare ad uno studio sulla tossicità cronica a lungo termine, occorre utilizzare una dieta simile in entrambi.

1.5.5 **Osservazioni**

Il periodo di osservazione deve essere di almeno 90 giorni. Gli animali del gruppo satellite destinato a osservazioni di follow-up non vanno trattati per un periodo adeguato, allo scopo di individuare la persistenza o la remissione degli effetti tossici.

Le osservazioni cliniche vanno effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla/e stessa/e ora/e, tenendo conto del periodo di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione. Occorre registrare le condizioni cliniche degli animali. Per identificare segni di morbidità e mortalità tutti gli animali vanno osservati almeno due volte al giorno, in genere all'inizio e alla fine della giornata.

Tutti gli animali vanno sottoposti a dettagliate osservazioni cliniche almeno una volta prima della prima esposizione (per consentire il confronto all'interno dei gruppi di soggetti) e, successivamente, una volta alla settimana. Le osservazioni vanno eseguite, se fattibile, fuori dalla gabbia di stabulazione, preferibilmente in un ambiente standard e sempre all'incirca allo stesso orario. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di osservazione. I segni di tossicità, compresi il momento dell'esordio, il grado e la durata, vanno accuratamente registrati. I segni da osservare sono almeno i seguenti: cambiamenti a livello cutaneo, del pelo, degli occhi e delle mucose, presenza di secrezioni ed escrezioni e attività neurovegetativa (ad esempio lacrimazione, piloerezione, reazioni pupillari, alterazioni della respirazione). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti tonici o clonici, stereotipie (ad esempio tendenza a pulirsi eccessivamente, a girare in cerchio) e qualsiasi comportamento insolito.

Prima della somministrazione della sostanza in esame e a conclusione dello studio occorre eseguire un esame oftalmologico, mediante un oftalmoscopio o analogo dispositivo idoneo, preferibilmente su tutti gli animali o comunque almeno sul gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata e sui controlli. Se si riscontrano alterazioni degli occhi correlate al trattamento è necessario esaminare tutti gli animali.

1.5.5.1 *Peso corporeo e assunzione di cibo/acqua*

Tutti gli animali vanno pesati almeno una volta alla settimana. La misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua di abbeveraggio, anche il consumo di acqua va misurato almeno con cadenza settimanale. È utile tener conto del consumo di acqua anche negli studi con somministrazione mediante dieta o sonda gastrica perché potrebbe risultare alterato.

1.5.5.2 *Ematologia e biochimica clinica*

Occorre prelevare campioni di sangue da un sito specifico e conservarli, se opportuno, in condizioni adeguate. Alla fine del test si raccolgono campioni di sangue subito prima o nel corso della procedura di soppressione degli animali.

Gli esami ematologici, compresi ematocrito, concentrazione di emoglobina, conta degli eritrociti, conta totale e differenziale dei leucociti, conta delle piastrine e una misurazione del potenziale di coagulazione scelta tra tempo di coagulazione, tempo di protrombina o tempo di tromboplastina, vanno eseguiti all'inizio dello studio e successivamente a intervalli mensili o a metà del periodo di test e infine alla conclusione del test.

Le determinazioni biochimiche cliniche per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, specificamente, gli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati da tutti gli animali all'inizio dello studio, poi a intervalli mensili o a metà del test, e infine a conclusione del periodo di test. Gli elementi da valutare sono l'equilibrio elettrolitico, il metabolismo dei carboidrati e la funzionalità epatica e renale. La scelta di test specifici sarà influenzata dalle osservazioni sulla modalità di azione della sostanza di prova. Prima della raccolta dei campioni di sangue, gli animali vanno lasciati a digiuno per un periodo adeguato alla specie. Si consiglia di determinare calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno, alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, ornitindecarbossilasi, gamma-glutamyl-transpeptidasi, azoto ureico, albumina, creatininemia, bilirubina totale e proteine sieriche totali.

L'analisi delle urine va effettuata almeno all'inizio dello studio e successivamente a metà e alla conclusione, raccogliendo le urine in tempi prestabiliti. Le determinazioni da effettuare comprendono aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche. Se necessario, per ampliare lo studio dell'effetto o degli effetti osservato/i è possibile impiegare ulteriori parametri.

È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sui marker dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per un'adeguata valutazione tossicologica comprendono le analisi dei lipidi, degli ormoni, equilibrio acidi/basi, metaemoglobina e inibizione della colinesterasi. Se necessario, per ampliare lo studio degli effetti osservati è possibile effettuare ulteriori esami biochimici clinici. Queste determinazioni vanno effettuate per alcune classi di sostanze chimiche oppure caso per caso.

Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile, in funzione delle specie e dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza.

1.5.5.3 *Necropsia macroscopica*

Tutti gli animali dello studio vanno sottoposti a completa e dettagliata necropsia macroscopica che comprende un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Fegato (compresa la cistifellea), reni, ghiandole surrenali, testicoli, epididimi, ovaie, utero, tiroide (con paratiroidi), timo, milza, cervello e cuore di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati nel frattempo) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento.

I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più adatto, sia per il tipo di tessuto, sia per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare: tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto, bulbo e/o ponte), midollo spinale (a tre livelli: cervicale, mediotoracico e lombare), ghiandola pituitaria, occhi, tiroide, paratiroide, timo, esofago, ghiandole salivari, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, cistifellea, pancreas, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, trachea e polmoni, aorta, gonadi, utero, annessi, ghiandola mammaria delle femmine, prostata, vescica, linfonodi (preferibilmente un linfonodo interessato dalla via di somministrazione e un altro distante dalla via di somministrazione per coprire gli effetti sistemici), un nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, una sezione di midollo osseo (e/o un aspirato di midollo osseo fresco) e cute. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

1.5.5.4 *Esame istopatologico*

Vanno sottoposti a esame istopatologico completo gli organi e i tessuti conservati di almeno tutti gli animali del gruppo di controllo e del gruppo che riceve la dose più elevata. Si procede a questo esame anche sugli animali degli altri gruppi qualora nel gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento.

Vanno esaminate tutte le lesioni macroscopiche.

Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1 **DATI**

I dati devono essere forniti separatamente per ogni soggetto. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo sperimentale il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante il test o sacrificati per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi/soppressioni, il numero di animali che presentano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, quali momento dell'esordio, durata e gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali rapportata al tipo di lesione.

I risultati numerici vanno valutati mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettabile. I metodi statistici e i dati da analizzare vanno scelti già in sede di determinazione del disegno sperimentale.

2.2 **RELAZIONE SUL TEST**

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

2.2.1 **Sostanza di prova:**

- natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche;
- dati identificativi;
- veicolo (se utilizzato): motivazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

2.2.2 **Specie di prova:**

- specie e ceppo usati;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;
- peso dei singoli animali all'inizio del test.

2.2.3 **Condizioni di esecuzione del test:**

- motivo della scelta del livello di dose;
- dettagli sulla formulazione della sostanza in esame/preparazione dietetica, sulla concentrazione ottenuta, sulla stabilità e l'omogeneità della preparazione;
- dettagli sulla somministrazione della sostanza in esame;
- dosi effettive (mg/kg di peso corporeo/die) e fattore di conversione dalla concentrazione della sostanza di prova nella dieta/acqua di abbeveraggio (ppm) alla dose effettiva, se del caso;
- particolari sulla qualità del cibo e dell'acqua.

2.2.4

Risultati:

- peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo;
- assunzione di cibo, ed eventualmente di acqua;
- dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, compresi segni di tossicità;
- natura, gravità e durata delle osservazioni cliniche (reversibili o meno);
- esame oftalmologico;
- test ematologici con i relativi valori basali;
- test biochimici clinici con i relativi valori basali;
- peso corporeo terminale, peso degli organi e rapporti tra peso degli organi e peso corporeo;
- risultati della necropsopia;
- descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici;
- dati sull'assorbimento, se disponibili;
- elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

B. 28

SAGGIO DI TOSSICITÀ CUTANEA SUBCRONICA

SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE CUTANEA RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La sostanza sperimentale viene applicata quotidianamente alle cute in dosi scalari a vari gruppi di animali da esperimento, una dose per gruppo per un periodo di 90 giorni. Durante il periodo di somministrazione, gli animali vengono giornalmente sottoposti ad osservazione per individuare segni di tossicità. Gli animali che muoiono durante il saggio vengono sottoposti a necropsia, ed alla conclusione della prova anche gli animali superstiti vengono sottoposti a necropsia.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento ed alimentazione per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo. Poco prima dell'inizio dell'esperimento gli animali da trattare vengono tosati nella zona dorsale del tronco. Si può usare la rasatura, ma questa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima del saggio. La tosatura o la rasatura usualmente deve essere ripetuta ad intervalli approssimativamente settimanali.

Durante la tosatura o la rasatura del pelo, occorre fare attenzione a non scorticare la pelle. La superficie corporea da trattare per l'applicazione della sostanza in esame non dovrebbe essere inferiore al 10% del totale. Il peso dell'animale dovrebbe essere preso in considerazione quando si decidono le dimensioni delle superficie da liberare dal pelo e dalla copertura. Quando si saggiano solidi, che possono essere polverizzati se del caso, la sostanza in esame dovrebbe essere umidificata sufficientemente con l'acqua o, se necessario, con un veicolo adatto per assicurare un buon contatto con la pelle. Le sostanze in esame liquide sono in genere usate non diluite. L'applicazione quotidiana si estenderà da 5 a 7 giorni per settimana.

Condizioni sperimentali

Animali da esperimento

Si possono utilizzare esemplari adulti di ratto, coniglio o cavia. Altre specie possono essere utilizzate, ma il loro uso richiede una giustificazione. All'inizio del saggio, la gamma di variazione del peso dovrebbe essere $\pm 20\%$ del peso medio. Quando uno studio di tossicità subcronica cutanea viene condotto come preliminare ad uno studio a lungo termine, in entrambi gli studi si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo.

Numero e sesso

Per ciascun livello di dose si dovrebbero utilizzare almeno 20 animali (10 maschi e 10 femmine) con pelle sana. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare ad intervalli alcuni animali, il numero totale dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Inoltre, un gruppo satellite di 20 animali (10 animali per sesso) può essere trattato con il livello di dose elevato per 90 giorni e sottoposto ad osservazione per l'individuazione della reversibilità, della persistenza o dell'insorgenza ritardata di effetti tossici per 28 giorni dopo il trattamento.

Livelli di dose

Almeno tre livelli di dose con un controllo o un controllo del veicolo, se si utilizza un veicolo, sono richiesti. Il periodo di esposizione dovrebbe essere di almeno 6 ore al giorno. L'applicazione della sostanza in esame dovrebbe essere eseguita ogni giorno alla stessa ora e la quantità di sostanza applicata dovrebbe essere aggiustata a intervalli (settimanali o bisettimanali) per mantenere un livello costante di dose in termini di peso corporeo dell'animale. Eccezione fatta per il trattamento con la sostanza in esame, gli animali nel gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico ai soggetti dei gruppi trattati. Quando per facilitare il dosaggio si usa un veicolo, il gruppo di controllo del veicolo dovrebbe essere sottoposto a dosaggio come i gruppi trattati, e ricevere la stessa quantità che riceve il gruppo a livello di dose più elevata. Il livello di dose più elevato dovrebbe provocare effetti tossici ma produrre pochi o nessun decesso. Il livello di dose più basso non dovrebbe produrre effetti tossici. Quando esista una valutazione utile di esposizione umana, il livello più basso dovrebbe superare questo valore.

Idealmente, il livello di dose intermedio dovrebbe produrre effetti tossici osservabili minimi. Se viene usata più di una dose intermedia, i livelli di dose dovrebbero essere intervallati per produrre una graduazione degli effetti tossici. Nei gruppi trattati con livello di dose basso, intermedio e nei controlli, l'incidenza delle morti dovrà essere bassa e tale da permettere una valutazione significativa dei risultati.

Se l'applicazione della sostanza in esame produce irritazioni gravi della pelle, le concentrazioni dovrebbero essere ridotte e ciò può provocare una riduzione, o l'assenza, di altri effetti tossici al livello di dose elevato. Se la pelle è stata gravemente danneggiata, può rendersi necessaria l'interruzione dello studio. Si procederà quindi a un nuovo studio con concentrazione più basse.

Saggio limite

Se uno studio preliminare con livello di dose di 1 000 mg/kg o un livello di dose più elevato in relazione a una possibile esposizione umana, quando questa sia nota, non produce effetti tossici, ulteriori prove possono non essere considerate necessarie.

Periodo di osservazione

Gli animali da esperimento dovrebbero essere osservati quotidianamente per individuare eventuali segni di tossicità. Il tempo della morte e quello dell'insorgenza o della scomparsa dei segni di tossicità dovrebbero essere registrati.

Procedimento

Gli animali dovrebbero essere ingabbiati individualmente e sottoposti a trattamento con la sostanza in esame, idealmente 7 giorni per settimana, per un periodo di 90 giorni.

Gli animali appartenenti a ciascun gruppo satellite previsto per ulteriori osservazioni dovrebbero essere mantenuti ancora per 28 giorni per individuare i sintomi di guarigione oppure di persistenza degli effetti tossici. Il tempo di esposizione dovrebbe essere 6 ore/giorno.

La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su un'area che è approssimativamente il 10% della superficie corporea totale. Con sostanze molto tossiche, la superficie coperta può essere inferiore, ma deve comunque essere coperta da uno strato più uniforme e più sottile possibile.

Durante l'esposizione, la sostanza in esame viene tenuta a contatto con la pelle da una fascia porosa di garza e da un nastro non-irritante. La superficie cutanea su cui è applicata la sostanza dovrebbe essere coperta opportunamente in modo da trattenere la fascia e la sostanza in esame, per evitare un'eventuale ingestione da parte degli animali della sostanza in esame. Si può ricorrere a mezzi per limitare i movimenti dell'animale, ma l'immobilizzazione completa non è un metodo raccomandato.

Alla fine del periodo di esposizione, la sostanza in esame residua dovrebbe essere rimossa, ove possibile, con l'uso di acqua o con qualche altro metodo appropriato per pulire la pelle.

Tutti gli animali dovrebbero essere quotidianamente sottoposti a osservazione e si dovrebbe registrare i segni di tossicità, incluso il tempo d'insorgenza, l'intensità e la durata. Le osservazioni collaterali dovrebbero includere i cambiamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, nonché del sistema nervoso centrale e autonomo, del sistema respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare e alla pesatura degli animali. L'osservazione regolare degli animali è necessaria per assicurarsi che gli stessi non siano persi a causa di cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Alla fine del periodo di studio tutti gli animali sopravvissuti dei gruppi di trattamento non satelliti sono sottoposti a necropsia. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necropsia.

I seguenti esami vengono effettuati abitualmente per tutti gli animali, compresi i controlli:

- a) l'esame oftalmoscopico, eseguito con un oftalmoscopio o attrezzatura analoga, dovrebbe essere effettuato prima della somministrazione della sostanza sperimentale e alla conclusione dello studio, preferibilmente su tutti gli animali, o perlomeno su quelli a cui vengono somministrati il dosaggio elevato, e infine al gruppo di controllo. Se vengono individuati cambiamenti negli occhi, tutti gli animali dovrebbero essere esaminati;

- b) alla fine del periodo di saggio, si dovrebbero effettuare le seguenti analisi: ematologia, incluso ematocrito, concentrazione di emoglobina degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, misurazione del potenziale di coagulazione, quale il tempo di coagulazione, il tempo di protrombina, il tempo di tromboplastina o il conteggio delle piastrine;
- c) la determinazione della biochimica clinica sul sangue dovrebbe essere effettuata alla fine del periodo di saggio. Le aree di studio, ritenute opportune per tutti gli studi sono: equilibrio degli elettroliti, metabolismo dei carboidrati, funzione epatica e renale. La selezione di prove specifiche sarà determinata dalle osservazioni sul modo di azione della sostanza. Si suggerisce di determinare: calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno (con periodo di digiuno appropriato alla specie), glutammico-piruvica transaminasi serica (¹), glutammico-ossalacetico transaminasi serica (²), ornitina decarbossilasi, gamma glutammil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine totali del siero. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per una valutazione tossicologica adeguata, includono: analisi dei lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina, attività della colinesterasi. Determinazioni biochimiche supplementari possono essere usate, se necessarie, per estendere la ricerca di effetti osservati;
- d) l'analisi delle urine non è richiesta routinariamente, ma solo quando vi sia una indicazione basata sulla tossicità prevista o osservata. Se i dati storici di base sono insufficienti, prima di iniziare il dosaggio si dovrebbe prendere in considerazione la determinazione dei parametri ematologici e di biochimica clinica.

Necropsia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti a necropsia macroscopica completa, che include l'esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e dei loro contenuti. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli devono essere pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti organi e tessuti dovrebbero essere conservati in mezzo adatto per possibili esami istopatologici futuri: tutte le lesioni macroscopiche; cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, (trachea), polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, fegato, milza, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, organi genitali accessori, cistifellea (se esiste), esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, (ghiandole mammarie femminili), (muscolatura della coscia), nervo periferico (occhi), (sterno con midollo osseo), (femore — compresa superficie articolare), (midollo spinale a tre livelli — cervicale, emitoracico e lombare) e (ghiandole lacrimali esorbitali). (I tessuti citati tra parentesi devono essere esaminati solo se presentano sintomi di tossicità o se vi siano indicazioni che sono l'organo-bersaglio coinvolto).

Esame istopatologico

- a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sulla cute normale e sulla cute trattata, e sugli organi e tessuti degli animali nel gruppo trattato con dosaggio elevato e nel gruppo di controllo;
- b) tutte le lesioni macroscopiche dovrebbero essere esaminate;
- c) gli organi-bersaglio dovrebbero essere esaminati anche nei gruppi trattati con altre dosi;
- d) quando si usano i ratti, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei polmoni degli animali dei gruppi trattati con dosaggi bassi e intermedi per l'individuazione di infezioni poiché ciò fornisce una valutazione appropriata dello stato di salute degli animali. Ulteriori esami istopatologici di routine possono non essere richiesti per gli animali di questi gruppi, ma devono sempre essere effettuati sugli organi che presentano lesioni nel gruppo trattato con dosi elevate;
- e) quando si fa uso di un gruppo satellite, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei tessuti e degli organi che presentano lesioni in altri gruppi trattati.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale degli animali che presentano ciascun tipo di lesione. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico appropriato. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta,
- condizione sperimentali,
- livello di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni,
- dati sulla risposta tossica per sesso e per dose,
- livello senza effetto, quando possibile,
- tempo della morte (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione della prova,
- descrizione degli effetti tossici o di altri effetti,
- tempo di osservazione di ogni segno anormale e successivo decorso,
- dati di alimentazione e sul peso corporeo,
- risultati oftalmologici,
- analisi ematologiche usate e risultati completi,
- analisi di biochimica clinica usati e risultati completi (compresi i risultati dell'analisi delle urine),
- risultati della necropsopia,
- descrizione particolareggiata di tutti di risultati istopatologici,
- elaborazione statistica dei risultati, quando possibile,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 29
SAGGIO DI TOSSICITÀ SUBCRONICA INALATORIA

SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE INALATORIA RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Diversi gruppi di animali da esperimento sono esposti quotidianamente per un periodo definito alla sostanza in esame in concentrazioni graduate, utilizzando una concentrazione per gruppo, per un periodo di 90 giorni. Quando si utilizza un veicolo per contribuire a generare una concentrazione appropriata della sostanza in esame nell'atmosfera, si dovrebbe utilizzare un gruppo di controllo per il veicolo. Durante il periodo di somministrazione, gli animali vengono giornalmente sottoposti ad osservazione per individuare segni di tossicità. Gli animali che muoiono durante il saggio sono sottoposti a necropsia; alla conclusione del saggio anche gli animali superstiti vengono sottoposti a necropsia.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni di alloggiamento e di alimentazione sperimentali per almeno cinque giorni prima dell'inizio della prova. Prima del saggio, animali giovani e sani sono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo.

Se necessario, un veicolo adatto può essere aggiunto alla sostanza in esame per contribuire a generare una concentrazione appropriata della sostanza nell'atmosfera. Se un veicolo o altri additivi vengono utilizzati per facilitare il dosaggio, essi dovrebbero essere noti per non produrre effetti tossici. Se del caso, i dati storici possono essere usati.

Condizioni sperimentali

Animali sperimentali

A meno che vi siano controindicazioni, la specie preferita è il ratto. Si dovrebbero usare animali sani giovani di ceppi comunemente usati in laboratorio. All'inizio dello studio la gamma di variazione del peso degli animali usati non dovrebbe essere superiore al $\pm 20\%$ del peso medio. Quando venga intrapreso uno studio subcronico per inalazione come preliminare ad uno studio a lungo termine, in entrambi gli studi si dovrebbe usare la stessa specie e stesso ceppo.

Numero e sesso

Per ciascuna concentrazione di esposizione si dovrebbero utilizzare almeno 20 animali (10 femmine e 10 maschi). Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare ad intervalli alcuni animali il numero dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Inoltre, un gruppo satellite di 20 animali (10 animali per sesso) può essere trattato con il livello di dose elevato per 90 giorni e sottoposto ad osservazione per l'individuazione della reversibilità, della persistenza o dell'insorgenza ritardata di effetti tossici per 28 giorni dopo il trattamento.

Concentrazione di esposizione

Sono richieste almeno tre concentrazioni, con un controllo o un controllo del veicolo (che corrisponde alla concentrazione del veicolo al livello più elevato) se si utilizza un veicolo. Eccezion fatta per il trattamento con la sostanza in esame, gli animali nel gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico agli animali dei gruppi. La concentrazione più elevata dovrebbe provocare effetti tossici ma nessuna o poche morti. Quando esista una valutazione utile dell'esposizione umana, la concentrazione più bassa dovrebbe superare detto valore. Idealmente la concentrazione media dovrebbe produrre effetti tossici osservabili minimi. Se viene usata più di una concentrazione intermedia le concentrazioni dovrebbero essere intervallate per produrre una graduazione di effetti tossici.

Nei gruppi trattati con concentrazioni basse ed intermedie e nei controlli, l'incidenza delle morti dovrebbe essere bassa per permettere una valutazione significativa dei risultati.

Tempo di esposizione

La durata dell'esposizione quotidiana dovrebbe essere di 6 ore, dopo la stabilizzazione delle concentrazioni delle camere di inalazione. Altri tempi di esposizione possono essere usati per esigenze specifiche.

Attrezzatura

Gli esperimenti sugli animali dovrebbero essere effettuati in apparecchiatura per inalazione progettata per sostenere una corrente dinamica d'aria con almeno 12 cambiamenti d'aria l'ora, per assicurare un tenore di ossigeno adeguato e un'atmosfera di esposizione a distribuzione uniforme. Quando si usa una camera di inalazione la progettazione dovrebbe essere tale da evitare l'affollamento degli animali e di aumentare al massimo la loro esposizione per inalazione alla sostanza in esame. Di massima, per assicurare la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» totale degli animali di saggio non dovrebbe superare il 5% del volume della camera di prova. Si può usare il sistema di esposizione oro-nasale, della testa soltanto o del corpo intero; i primi due sistemi ridurranno al massimo l'assorbimento da altre vie.

Periodo di osservazione

Gli animali sperimentali dovrebbero quotidianamente essere sottoposti ad osservazione per individuare i segni di tossicità durante l'intero periodo di trattamento e di recupero. Si dovrebbe registrare anche il tempo della morte e quello dell'insorgenza o della scomparsa dei segni di tossicità.

Procedimento

Gli animali vengono esposti alla sostanza in esame 5-7 giorni per settimana, per un periodo di 90 giorni. Gli animali appartenenti ai gruppi satelliti previsti per ulteriori osservazioni dovrebbero essere tenuti ancora per 28 giorni senza trattamento per individuare la guarigione o la persistenza degli effetti tossici. La temperatura durante la prova dovrebbe essere mantenuta a 22 °C (± 3 °C). Idealmente, l'umidità relativa dovrà essere mantenuta tra il 30% ed il 70%, ma in certi casi (ad esempio, saggi di aerosols) ciò potrebbe non essere possibile. Il cibo e l'acqua non dovrebbero essere somministrati durante l'esposizione.

Si dovrebbe usare un sistema dinamico con un idoneo sistema di controllo analitico della concentrazione. Per stabilire le opportune concentrazioni di esposizione si raccomanda di effettuare una prova. Il flusso d'aria dovrebbe essere regolato in modo da garantire che le condizioni nella camera d'esposizione siano omogenee. Il sistema dovrebbe garantire che condizioni stabili di esposizione siano realizzate il più rapidamente possibile.

Si dovrebbero misurare e controllare:

- a) la velocità della corrente d'aria (in continuo);
- b) la concentrazione reale della sostanza in esame misurata nella zona di respirazione. Durante il periodo di esposizione quotidiana, la concentrazione non dovrebbe subire variazioni più del $\pm 15\%$ del valore medio. Tuttavia, nel caso delle polveri e degli aerosols questo livello di controllo potrebbe non essere realizzabile e un più vasto intervallo sarebbe quindi accettabile. Durante tutto il periodo dello studio la concentrazione giornaliera dovrebbe essere tenuta costante nei limiti del possibile. Durante la messa a punto del sistema di generazione si dovrebbe eseguire l'analisi delle dimensioni e delle particelle per stabilire la stabilità delle concentrazioni di aerosol. Durante l'esposizione, le analisi dovrebbero essere effettuate con la necessaria frequenza per determinare l'uniformità di distribuzione delle dimensioni delle particelle;
- c) temperatura ed umidità;
- d) durante e dopo l'esposizione le osservazioni sono effettuate e registrate sistematicamente; per ogni animale si dovrebbero tenere registri individuali. Tutti gli animali dovrebbero essere osservati quotidianamente e si dovrebbero registrare i segni di tossicità, incluso il tempo di insorgenza, il grado e la durata. Le osservazioni collaterali dovrebbero includere i cambiamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare ed alla pesatura degli animali. L'osservazione regolare degli animali è necessaria per assicurare che gli stessi non siano

persi per lo studio a causa di cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Alla fine del periodo di studio tutti gli animali sopravvissuti sono sottoposti a necropsia. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necropsia, quando notati.

I seguenti esami vengono effettuati abitualmente per tutti gli animali, compresi i controlli:

- a) l'esame oftalmoscopico, eseguito con un oftalmoscopio o idonea attrezzatura analoga, dovrebbe essere effettuato prima dell'esposizione alla sostanza in esame e alla conclusione dello studio, preferibilmente su tutti gli animali o perlomeno su quelli cui viene somministrato il dosaggio elevato e al gruppo di controllo. Se vengono individuati cambiamenti agli occhi tutti gli animali dovrebbero essere esaminati;
- b) alla fine del periodo di saggio, si dovrebbero effettuare le seguenti analisi: ematologia, incluso ematocrito, concentrazione di emoglobina, conteggio degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, misura del potenziale di coagulazione, quale il tempo di coagulazione, il tempo di protrombina, il tempo di tromboplastina o conteggio delle piastrine;
- c) la determinazione della biochimica clinica sul sangue dovrebbe essere effettuata alla fine del periodo di saggio. Le aree di saggio che sono considerate opportune per tutti gli studi sono: equilibrio degli elettroliti, metabolismo dei carboidrati, funzione epatica e renale. La selezione delle prove specifiche sarà determinata dalle osservazioni sul modo di azione della sostanza. Si suggerisce di determinare: calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno (con periodo di digiuno appropriato alla specie), glutammilico-piruvico transaminasi serica ⁽¹⁾, glutammilico-ossalacetico transaminasi serica ⁽²⁾, ornitina decarbossilasi, gamma glutammil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina nel sangue, bilirubina totale e misurazione delle proteine totali del siero. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per una valutazione tossicologica adeguata, includono: analisi dei lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina, attività della colinesterasi. Determinazione biochimiche supplementari possono essere usate, se necessario, per estendere la ricerca sugli effetti osservati;
- d) l'analisi delle urine non è richiesta routinariamente, ma solo quando vi siano indicazioni basate sulla tossicità prevista o osservata.

Se i dati storici di base sono insufficienti, prima di iniziare il dosaggio si dovrebbe prendere in considerazione la determinazione dei parametri ematologici e di biochimica clinica.

Necropsia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti a necropsia macroscopica completa, che include l'esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e dei loro contenuti. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovranno essere pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti organi e tessuti dovrebbero essere conservati in mezzo adatto per possibili esami istopatologici futuri: tutte le lesioni generali, polmoni — che dovrebbero essere rimossi intatti, pesati e trattati con un fissativo adatto per garantire che la struttura polmonare rimanga intatta (la perfusione con fissativo è considerata un procedimento efficace), tessuti rinofaringei, cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, trachea e polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, milza, fegato, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, (organi genitali accessori), (pelle), cistifellea (se presente), esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, (ghiandole mammarie femminili), (muscolatura della coscia), nervo periferico (occhi), sterno con midollo osseo, (femore — compresa superficie articolare), (midollo spinale a tre livelli — cervicale, emitoracico e lombare), e (ghiandole lacrimali esorbitali). (I tessuti citati tra parentesi devono essere esaminati solo se presentano segni di tossicità o se vi siano indicazioni che sono l'organo-bersaglio coinvolto).

Esame istopatologico

- a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sulle vie respiratorie e su altri organi e tessuti di tutti gli animali nel gruppo trattato con dosaggio elevato e nel gruppo di controllo;
- b) tutte le lesioni macroscopiche dovrebbero essere esaminate;
- c) gli organi-bersaglio in gruppi trattati con altre dosi dovrebbero essere esaminati;
- d) i polmoni degli animali nei gruppi trattati con dosaggio basso ed intermedio dovrebbero essere sottoposti ad esame istopatologico per l'individuazione di infezioni, poiché ciò fornisce una valutazione appropriata dello stato di salute degli animali. Ulteriori esami istopatologici di routine possono non essere richiesti per gli animali di questi gruppi, ma devono sempre essere effettuati sugli organi che presentano lesioni nel gruppo trattato con dose elevata;
- e) quando si fa uso di gruppo satellite, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico degli stessi tessuti e degli organi che presentano effetti in altri gruppi trattati.

⁽¹⁾ Ora nota come alanina aminotransferasi serica.

⁽²⁾ Ora nota come aspartato aminotransferasi serica.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio del saggio, il numero degli animali che presentano lesioni, i tipi di lesione e la percentuale degli animali che presenta ciascun tipo di lesioni. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta;
- condizioni sperimentali:
 - descrizione dell'apparecchiatura di esposizione inclusi progettazione, tipo, dimensioni, generatore dell'aria, sistema di generazione delle particelle e degli aerosols, metodo di condizionamento dell'aria, trattamento dell'aria di scarico e metodo di alloggiamento degli animali in una camera di saggio, quando questa sia usata. L'attrezzatura per la misura della temperatura, dell'umidità e, se del caso, della stabilità delle concentrazioni di aerosol o delle dimensioni delle particelle dovrebbe essere descritta;
 - dati di esposizione: i dati dovrebbero essere tabulati presentati con valori medi e una misura della variabilità (per esempio deviazione standard) e dovrebbero includere:
 - a) velocità del flusso dell'aria attraverso l'attrezzatura per l'inalazione,
 - b) temperatura ed umidità dell'aria,
 - c) concentrazioni nominali (quantità totale della sostanza in esame immessa nell'apparecchiatura per l'inalazione, divisa per il volume dell'aria),
 - d) natura del veicolo, se usato,
 - e) concentrazione reali nella zona di respirazione,
 - f) dimensioni delle particelle mediane (se del caso):
- dati sulla risposta tossica per sesso e per concentrazione;
- livello senza effetto, quando possibile;
- tempo della morte (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alle conclusioni della prova;
- descrizione degli effetti tossici o di altri effetti;
- tempo di osservazione di ogni segno anomalo e successivo decorso;
- dati di alimentazione sul peso corporeo;
- risultati oftalmologici;
- prove ematologiche usate e risultati completi;
- prove di biochimica clinica usate e risultati (compresi i risultati dell'analisi delle urine);
- risultati della necropsopia;
- descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici;
- elaborazione statistica dei risultati, quando possibile;
- discussione dei risultati;
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 30

SAGGIO DI TOSSICITÀ CRONICA

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

La sostanza in esame è somministrata normalmente 7 giorni per settimana, per una via opportuna, a diversi gruppi di animali sperimentali, una dose per gruppo, per la maggior parte della loro durata di vita. Durante e dopo l'esposizione alla sostanza in esame, gli animali sperimentali sono sottoposti ad osservazione quotidianamente per individuare segni di tossicità.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni di alloggiamento e nutrizione sperimentali per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mescolati con metodo casuale ed assegnati a gruppi di trattamento e di controllo.

Condizioni di saggio

Animali da laboratorio

La specie preferita è il ratto. Sulla base dei risultati di studi precedentemente effettuati, altre specie (roditori o non-roditori) possono essere utilizzate. Si dovrebbero usare i ceppi di laboratorio generalmente utilizzati di giovani animali sani ed il dosaggio dovrebbe iniziare non appena possibile dopo lo svezzamento.

All'inizio dello studio, la variazione di peso negli animali usati non dovrebbe superare il $\pm 20\%$ del valore medio. Quando venga intrapreso uno studio di tossicità subcronica orale come preliminare ad uno studio a lungo termine, si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo in entrambi gli studi.

Numero e sesso

Per ciascun livello di dose si dovrebbero utilizzare, per i roditori, almeno 40 animali (20 maschi e 20 femmine) e un gruppo di controllo parallelo. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare alcuni animali, il loro numero dovrà essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio.

Per i non-roditori un numero inferiore di animali, almeno 4 per sesso e per gruppo, è accettabile.

Livelli di dose e frequenza dell'esposizione

Si dovrebbero utilizzare almeno tre livelli di dose oltre al gruppo di controllo. Il livello di dose più elevato dovrebbe provocare sintomi precisi di tossicità senza causare eccessiva mortalità. Il livello di dose più basso non dovrebbe produrre alcuna evidenza di tossicità.

La dose (le dosi) intermedia(e) dovrebbe(ro) essere fissata(e) in un intervallo intermedio tra le dosi elevate e quelle basse.

Nella scelta dei livelli di dose si dovrebbe tener conto dei dati ottenuti da precedenti saggi e studi di tossicità.

Normalmente, la frequenza dell'esposizione è quotidiana. Se la sostanza chimica viene somministrata in acqua potabile o mescolata nella dieta, essa dovrebbe essere continuamente disponibile.

Controlli

Si dovrebbe usare un gruppo di controllo parallelo identico sotto tutti i punti di vista ai gruppi esposti, eccezion fatta per l'esposizione alla sostanza in esame.

In circostanze specifiche, come in studi di inalazione che richiedono l'uso di aerosol o di un emulsionante ad attività biologica non caratterizzata in studi orali, si dovrebbe usare anche un gruppo di controllo negativo parallelo. In gruppo di controllo negativo riceve lo stesso trattamento degli altri gruppi di animali sperimentali, eccettuato il fatto che gli animali non sono esposti alla sostanza sperimentale né ad alcun veicolo.

Vie di somministrazione

Le due vie principali di somministrazione sono quella orale e quella inalatoria. La scelta della via di somministrazione dipende dalle caratteristiche fisiche e chimiche della sostanza in esame e della via probabile di esposizione dell'uomo.

L'uso della via cutanea presenta considerevoli problemi pratici. La tossicità sistematica cronica derivante dall'assorbimento percutaneo può essere arguita normalmente dai risultati dell'altra prova orale e dalla conoscenza dell'entità dell'assorbimento percutaneo derivata dalle prove di tossicità percutanea.

Studi orali

Ove la sostanza in esame sia assorbita dal tratto gastro-intestinale, e se la via orale è una via di esposizione degli esseri umani, la via orale di somministrazione è quella preferita, a meno che non vi siano controindicazioni. Gli animali possono ricevere la sostanza in esame nella loro dieta, sciolta in acqua potabile, o in capsula. Idealmente, dovrebbe essere usato un dosaggio giornaliero, sette giorni per settimana, perché un dosaggio di cinque giorni/settimana potrebbe provocare un recupero o una tossicità da privazione nel periodo di mancato dosaggio, influenzando così il risultato e la valutazione successiva. Tuttavia, sulla base principalmente di considerazioni pratiche, il dosaggio su una base di cinque giorni/settimana è considerato accettabile.

Studi di inalazione

Poiché gli studi sull'inalazione offrono problemi tecnici di maggior complessità delle altre vie di somministrazione, vengono qui fornite indicazioni più particolareggiate su questo modo di somministrazione. Dovrebbe essere notato che l'installazione endotracheale può costituire un'alternativa valida in situazioni specifiche.

Le esposizioni a lungo termine sono di solito modellate sulla esposizione umana prevista, che prevede per gli animali un'esposizione quotidiana di 6 ore dopo equilibratura delle concentrazioni nella camera, per 5 giorni/settimana (esposizione intermittente), o su un'esposizione ambientale possibile, con 22-24 ore di esposizione/giorno, 7 giorni/settimana (esposizione continua), con circa un'ora/giorno per nutrire gli animali allo stesso orario e per la manutenzione della camera.

In entrambi i casi, gli animali sono di solito esposti a concentrazioni fisse delle sostanze in esame. Una differenza importante da considerare tra l'esposizione intermittente e quella continua è che, con la prima, vi è un periodo di 17-18 ore in cui gli animali possono riprendersi dagli effetti di ogni esposizione quotidiana, e un periodo di recupero ancora più lungo durante i fine settimana.

La scelta dell'esposizione intermittente o continua dipende dagli obiettivi dello studio e dall'esposizione umana che deve essere simulata. Tuttavia, certe difficoltà tecniche devono essere considerate. Per esempio, i vantaggi dell'esposizione continua per simulare le condizioni ambientali possono essere controbilanciati dalla necessità di nutrire e abbeverare gli animali durante l'esposizione, o di disporre di aerosol di tipo più complicato (e affidabile) e di sistemi di generazione di vapore e di controllo.

Camere di esposizione

Gli animali dovrebbero essere sottoposti a sperimentazione in camere di inalazione progettate per sostenere un flusso dinamico con almeno 12 cambiamenti d'aria/ora, per assicurare un tenore di ossigeno adeguato e un'atmosfera di esposizione uniforme. Le camere di esposizione e di controllo dovrebbero essere identiche nella costruzione e nella progettazione, per poter assicurare condizioni di esposizione comparabili sotto tutti gli aspetti, eccezion fatta per l'esposizione alle sostanze in esame. Nella camera viene generalmente mantenuta una leggera depressione per impedire la fuoriuscita delle sostanze in esame nella zona circostante. Nelle camere si dovrebbe ridurre al minimo l'affollamento degli animali. Come regola generale, al fine di assicurare la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» totale degli animali di saggio non dovrebbe superare il 5% del volume della camera.

Si dovrebbero eseguire le misure o i controlli sottoelencati:

- i) Flusso dell'aria: la velocità del flusso d'aria attraverso la camera dovrebbe essere controllata preferibilmente in modo continuo.
- ii) Concentrazione: durante il periodo di esposizione quotidiana, la concentrazione della sostanza in esame non dovrebbe variare di più o meno il 15 % del valore medio.
- iii) Temperatura ed umidità: per i roditori la temperatura dovrebbe essere mantenuta sui 22 °C (± 2 °C), e l'umidità all'interno della camera al 30-70 %, eccetto quando l'acqua è usata per mantenere in sospensione la sostanza di prova nell'atmosfera della camera. Preferibilmente entrambe dovrebbero essere controllate in continuo.
- iv) Misura delle dimensioni delle particelle: la distribuzione delle dimensioni delle particelle dovrebbe essere determinata sulle atmosfere di camere che contengano aerosol liquidi o solidi. Le particelle contenute negli aerosol dovrebbero avere dimensioni tali da essere inalabili dall'animale da laboratorio usato. I campioni di atmosfera dovrebbero essere prelevati a livello della zona di respirazione degli animali. Il campione d'aria dovrebbe essere rappresentativo della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono esposti e dovrebbe rappresentare, su una base gravimetrica, tutto l'aerosol sospeso anche quando gran parte di esso non è respirabile. Le analisi della grandezza delle particelle dovrebbero essere effettuate spesso durante la messa a punto del sistema di generazione per assicurare la stabilità dell'aerosol e, in seguito, quando si ritenga necessario, durante le esposizioni, per determinare in modo adeguato l'uniformità della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono stati esposti.

Durata dello studio

La durata del periodo di somministrazione dovrebbe essere di almeno 12 mesi.

Procedimento

Osservazioni

Un accurato esame clinico dovrebbe essere eseguito almeno quotidianamente. Oltre alle osservazioni supplementari, si dovrebbero adottare le misure appropriate per ridurre al massimo la perdita di animali, ad esempio necropsia o refrigerazione degli animali trovati morti e isolamento o sacrificio degli animali deboli o moribondi. Si dovrebbero eseguire accurate osservazioni per individuare l'insorgere e la progressione di tutti gli effetti tossici e per ridurre al massimo le perdite dovute a malattia, ad autolisi, o a cannibalismo.

I segni clinici, comprese le alterazioni oculari e neurologiche nonché la mortalità, dovrebbero essere registrati per tutti gli animali. Si dovrebbero registrare il tempo di insorgenza e la progressione delle condizioni tossiche, compresi i tumori sospetti.

Una registrazione individuale del peso corporeo di tutti gli animali dovrebbe essere effettuata una volta per settimana, durante le prime 13 settimane del periodo di saggio ed almeno una volta ogni 4 settimane in seguito. La quantità di cibo ingerita dovrebbe essere determinata settimanalmente durante le prime 13 settimane dello studio, e poi a intervalli di circa tre mesi, a meno che lo stato di salute o le variazioni del peso corporeo non impongano altre soluzioni.

Esame ematologico

L'esame ematologico (ad esempio: contenuto di emoglobina, volume delle cellule ammassate, eritrociti totali, leucociti totali, piastrine, o altre misure di potenziale di coagulazione) dovrebbe essere eseguito dopo 3 mesi, 6 mesi e quindi a intervalli di circa 6 mesi, ed alla conclusione dello studio, su campioni di sangue raccolti da tutti i non-roditori e da 10 ratti per sesso di tutti i gruppi. Se possibile, questi prelievi dovrebbero essere effettuati ogni volta sugli stessi ratti. Inoltre, si dovrebbe raccogliere un campione prima dell'esperimento dai non-roditori.

Se le osservazioni cliniche indicano un deterioramento nella salute degli animali durante lo studio, si dovrebbe eseguire un conteggio differenziale ematico dei suddetti animali.

Un conteggio differenziale ematico viene eseguito sui campioni provenienti dagli animali del gruppo a dosaggio più elevato e dai controlli. I conteggi differenziali ematici sono eseguiti per il gruppo seguente (o i gruppi seguenti) trattato con dosaggio inferiore, soltanto se vi sono discordanze importanti tra il gruppo trattato con dosaggio più elevato e i controlli, o se vi sono indicazioni derivanti dai risultati dall'esame patologico.

Analisi delle urine

Per l'analisi si dovrebbero prelevare campioni di urina da tutti i non-roditori e da 10 ratti per sesso di tutti i gruppi, se possibile dagli stessi ratti ed agli stessi intervalli dell'esame ematologico. Le seguenti determinazioni dovrebbero essere effettuate o sui singoli animali o su una miscela dei campioni per sesso e per gruppo di roditori:

— aspetto: volume e densità per i singoli animali;

- proteine, glucosio, chetoni, sangue occulto (semiquantitativamente);
- microscopia del sedimento (semiquantitativamente).

Chimica clinica

Approssimativamente a intervalli di 6 mesi, ed alla conclusione del saggio, si prelevano campioni di sangue per le determinazioni di chimica clinica da tutti i non-roditori e da 10 ratti/sexo di tutti i gruppi, se possibile dagli stessi ratti a ogni intervallo. Inoltre si dovrebbe prelevare un campione prima dell'esperimento dai non-roditori. Da questi campioni viene preparato il plasma e vengono eseguite le seguenti analisi:

- concentrazione delle proteine totali;
- concentrazione dell'albumina;
- saggio di funzionalità epatica (quali attività fosfatasi alcalina, glutammico-piruvico transaminasi ⁽¹⁾ e transaminasi glutammico-ossalacetica ⁽²⁾), glutammil transpeptidasi, ornitina decarbossilasi);
- metabolismo dei carboidrati, quali glucosio ematico a digiuno;
- saggi di funzionalità renale, quali azoto ureico ematico.

Necropsia macroscopica

È necessario un esame necropsico completo di tutti gli animali, compresi quelli morti durante l'esperimento o uccisi perché moribondi. Prima del sacrificio da tutti gli animali si dovrebbero prelevare campioni di sangue per i conteggi differenziali ematici. Tutte le lesioni macroscopiche visibili, i tumori o le lesioni sospette quali tumori dovrebbero essere conservate. Si dovrebbe cercare di correlare le osservazioni macroscopiche con i risultati degli esami microscopici.

Tutti gli organi e i tessuti dovrebbero essere conservati per l'esame istopatologico. Questo di solito riguarda i seguenti organi e tessuti: cervello ⁽³⁾ (midollo/ponte, corteccia cerebellare, corteccia cerebrale), pituitaria, tiroide (compresa paratiroide), timo, polmoni (trachea compresa), cuore, aorta, ghiandole salivari, fegato ⁽³⁾, milza, reni ⁽³⁾, ghiandole surrenali ⁽³⁾, esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, utero, vescica urinaria, linfonodi, pancreas, gonadi ⁽³⁾, organi genitali accessori, ghiandole mammarie femminili, pelle, muscolatura, nervo periferico, midollo spinale (cervicale, toracico, lombare), sterno con midollo osseo e femore (articolazione compresa) e occhi. L'insufflazione dei polmoni e della vescica urinaria con un fissativo è il modo ottimale di conservare questi tessuti; l'insufflazione dei polmoni negli studi di inalazione è essenziale per eseguire un esame istopatologico appropriato. Negli studi speciali, quali quelli di inalazione, si studieranno l'intero tratto respiratorio compreso naso, faringe e laringe.

Se si eseguono altri esami clinici, le informazioni ottenute da questi dovranno essere disponibili prima dell'esame microscopico, perché esse possono fornire indicazioni significative al patologo.

Istopatologia

Tutte le alterazioni visibili, in particolare i tumori ed altre lesioni che si verificano in qualsiasi organo, dovrebbero essere esaminati microscopicamente. Inoltre si raccomandano le seguenti procedure:

- a) esame microscopico di tutti gli organi e tessuti conservati, con descrizione completa di tutte le lesioni riscontrate in:
 1. tutti gli animali che sono morti durante lo studio, e
 2. tutti quelli dei gruppi trattati con la dose elevata e controlli. Questi organi, prelevati da 10 animali per sesso e per gruppo per i roditori e da tutti i non-roditori, più tiroide (con paratiroide) per tutti i non-roditori, dovrebbero essere pesati;
- b) gli organi o i tessuti che mostrano anomalie causate, o possibilmente causate dalla sostanza in esame, vengono esaminati anche negli animali appartenenti ai gruppi trattati con le dosi più basse;
- c) se il risultato dell'esperimento evidenzia una riduzione sostanziale della longevità normale degli animali o induzione di effetti in grado di influire sulla risposta tossica, gli animali del gruppo trattato con livello di dose immediatamente inferiore dovrebbero essere esaminati come sopra descritto;
- d) informazioni sull'incidenza di lesioni normalmente riscontrate nel ceppo degli animali usati, nelle stesse condizioni di laboratorio ossia i dati storici dei controlli sono indispensabili per valutare correttamente l'importanza dei mutamenti osservati negli animali trattati.

⁽¹⁾ Ora nota come alanino-amminotransferasi serica.

⁽²⁾ Ora nota come aspartato-amminotransferasi serica.

⁽³⁾ Questi organi, prelevati da 10 animali per sesso e per gruppo per i roditori e da tutti i non-roditori, più tiroide (con paratiroidi) per tutti i non-roditori, dovrebbero essere pesati.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio del saggio, il numero degli animali che presenta lesioni e la percentuale degli animali che presenta ciascun tipo di lesione. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta;
- condizioni sperimentali:
 - descrizione dell'apparecchiatura per l'esposizione, inclusi: progettazione, tipo, dimensioni, fonte dell'aria, sistema per generare particelle e aerosol, metodo di condizionamento dell'aria, trattamento dell'aria di scarico e metodo di alloggiamento degli animali in una camera di saggio, quando questa è utilizzata. L'attrezzatura per misurare la temperatura, l'umidità e, se del caso, la stabilità di concentrazione degli aerosol o la dimensione delle particelle dovrebbe essere descritta;
 - dati di esposizione: dovrebbero essere presentati in forma tabulare con i valori medi e una misura della variabilità (per esempio: deviazione standard) e dovrebbero includere:
 - a) portate dell'aria attraverso l'attrezzatura di inalazione,
 - b) temperatura ed umidità dell'aria,
 - c) concentrazioni nominali (quantità totale della sostanza in esame immessa nell'attrezzatura di inalazione divisa per il volume dell'aria),
 - d) natura del veicolo, se usato,
 - e) concentrazioni reali nella zona sperimentale di respirazione,
 - f) dimensioni delle particelle medianti (se del caso);
- livelli di dose (incluso il veicolo, se usato) e le concentrazioni;
- dati relativi agli effetti tossici per sesso e dose;
- livello senza effetti;
- tempo di eventi letali durante lo studio o se gli animali erano vivi al completamento del saggio;
- descrizione degli effetti tossici e di altri effetti;
- registrazione della data di osservazione di ogni sintomo anomalo e successivo decorso;
- dati di alimentazione e di peso corporeo;
- risultati oftalmologici;
- prove ematologiche usate e risultati completi;
- saggi di biochimica clinica usati e risultati completi (compresi i risultati dell'analisi delle urine);
- risultati della necropsia;
- descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici;
- elaborazione statistica dei risultati, quando possibile;
- discussione dei risultati;
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 31

SAGGIO DI TERATOGENESI: RODITORI E NON-RODITORI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La sostanza sperimentale viene somministrata in dosi o concentrazioni graduate, per almeno quella parte della gravidanza che copre il periodo dell'organogenesi, a diversi gruppi di animali sperimentali gravidi, una dose per gruppo. Poco prima della data prevista del parto l'animale viene ucciso, l'utero tolto ed il contenuto esaminato. Questo metodo sperimentale copre la embriotossicità e la fetotossicità.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Le giovani femmine vergini adulte in buona salute, di età e dimensioni comparabili, vengono acclimate in condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dello studio; vengono poi accoppiate con maschi di comprovata fertilità. Le femmine inseminate vengono randomizzate ed assegnate ai gruppi di trattamento. L'accoppiamento può avvenire naturalmente o tramite inseminazione artificiale. La sostanza da saggiare viene somministrata ogni giorno alle femmine, immediatamente dopo l'impianto e durante l'intero periodo dell'organogenesi. Un giorno prima del termine, i feti vengono asportati con isterectomia ed esaminati per determinare eventuali anomalie viscerali o scheletriche, includenti ossificazione ritardata, ritardo della crescita ed emorragie intestinali.

Condizioni sperimentali

Animali da laboratorio

Le specie generalmente usate sono il ratto, il topo, il criceto ed il coniglio. Le specie preferite sono il ratto ed il coniglio. Sarà opportuno usare ceppi generalmente utilizzati in laboratorio. Il ceppo non dovrà essere a bassa fecondità e dovrà essere caratterizzato per la sua risposta ai teratogeni. Gli animali dovranno essere ingabbiati individualmente.

Numero e sesso

Per ogni livello di dose si richiedono almeno 20 femmine di ratto, di topo o di criceto gravide, oppure 12 coniglie. L'obiettivo è di assicurare un numero sufficiente di parti per permettere una valutazione del potenziale teratogeno della sostanza.

Livelli di dose

Si richiedono almeno 3 gruppi di dosaggio e un gruppo di controllo. Quando la sostanza da saggiare è somministrata in un veicolo, si richiede anche un gruppo di controllo del veicolo. Se si utilizza un veicolo, le sue proprietà tossicologiche dovranno essere note; esso non dovrà essere teratogeno né avere effetti sulla riproduzione. Ad eccezione del trattamento con la sostanza da saggiare, gli animali nel gruppo di controllo dovranno essere

trattati in modo identico agli animali del gruppo trattato. A meno che non sia limitato dalla natura fisico/chimica o dalle proprietà biologiche della sostanza, il livello più elevato di dose dovrà idealmente indurre una certa tossicità materna evidente, quale una leggera perdita del peso, ma non più del 10% di morti. Il livello basso di dose non dovrà indurre effetti osservabili attribuibili alla sostanza da saggiare. La dose intermedia dovrà essere intervallata geometricamente tra i livelli di dose elevati e quelli bassi.

Prova limite

Nel caso di sostanza a bassa tossicità, se un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg non produce sintomi di embriotossicità o di teratogenicità, prove con altri livelli di dose possono essere considerate superflue.

Tempo di esposizione

Il giorno 0 nella prova è il giorno in cui sono osservati (se possibile) il tappo vaginale e/o lo sperma. Il periodo in cui si somministra la dose dovrebbe riguardare il periodo principale dell'organogenesi. Per il ratto ed il topo, questo può essere compreso fra il 6° e il 15° giorno; tra il 6° e il 14° per il criceto, e per il coniglio tra il 6° e il 18°. Se il giorno 0 è quello in cui si è osservato l'accoppiamento o l'inseminazione artificiale, ai tempi di cui sopra si dovrà aggiungere 1 giorno. Alternativamente, il periodo del dosaggio può essere esteso approssimativamente di 1 giorno prima della data prevista per il parto.

Periodo di osservazione

Un accurato esame clinico dovrà essere fatto almeno una volta al giorno. Osservazioni supplementari dovranno avvenire quotidianamente, con azioni appropriate prese per minimizzare la perdita di animali durante l'esperimento.

Procedimento

La sostanza da saggiare è somministrata oralmente, con sonda.

La sostanza da saggiare dovrà essere somministrata approssimativamente ogni giorno alla stessa ora.

Agli animali la laboratorio di sesso femminile viene somministrata ogni giorno la sostanza da saggiare, durante il periodo prescritto. La dose può essere basata sul peso delle femmine all'inizio della somministrazione della sostanza, o, alternativamente, in vista del rapido aumento di peso che ha luogo durante la gravidanza, gli animali possono essere pesati periodicamente, ed il dosaggio basato sulla determinazione più recente del peso. I sintomi di tossicità dovranno essere registrati al momento dell'osservazione, insieme con la data di inizio, il grado e la durata. Le femmine che minacciano l'aborto o il parto prematuro dovranno essere sacrificate e sottoposte ad esame macroscopico accurato. Il periodo di osservazione post-trattamento dovrà continuare fino a circa un giorno prima del termine; l'obiettivo è di coprire la maggior parte del periodo di gravidanza, ma di evitare eventuali complicazioni di interpretazione dei risultati che potrebbero sorgere in seguito alle nascite naturali. Le osservazioni parallele includeranno, ma con si limiteranno a: modificazione della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del modello comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare e alla pesatura degli animali.

Necropsia macroscopica

Alla morte, durante, o alla fine dello studio, l'animale dovrà essere sottoposto ad esame macroscopico per identificare tutte le anomalie strutturali o le modificazioni patologiche che hanno potuto influenzare la gravidanza. Immediatamente dopo la morte, l'utero dovrà essere tolto ed il contenuto esaminato per eventuale constatazione di morte dell'embrione o del feto e del numero di feti vivi. In genere, è possibile stimare la data di morte nell'utero, quando questa si è verificata. Nei ratti e nei conigli è possibile determinare il numero dei corpi lutei.

Si determinerà il sesso dei feti, si eseguirà la relativa pesatura individuale con registrazione e derivazione del peso fetale medio. Dopo la rimozione ogni feto dovrà essere esaminato esternamente. Per i ratti, i topi e i criceti, la metà di ogni figliata dovrà essere preparata per l'osservazione di anomalie scheletriche, e la parte rimanente di ogni figliata verrà preparata per l'osservazione di anomalie o sintomi di eventuale disfacimento tissulare usando metodi appropriati. Per i conigli, ogni feto verrà esaminato con accurata dissezione per il riscontro di anomalie viscerali e di anomalie scheletriche.

2.

DATI

I dati devono essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio della prova, il numero di quelli divenuti gravidi, il numero e le percentuali dei feti vivi e dei feti che presentano anomalie scheletriche o disfacimento tissulare nonché la loro relazione con figliate specifiche. I risultati devono essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.,
- condizioni sperimentali,
- livelli di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni,
- dati sulla risposta tossica per dose,
- livello senza effetto (quando possibile),
- registrazione della data della morte durante lo studio oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione della prova,
- descrizione degli effetti tossici o di altri effetti,
- registrazione della data di osservazione di ogni sintomo anomalo e successivo decorso,
- dati sulla alimentazione e sul peso corporeo,
- durata della gravidanza e dati sulle figliate (inclusi dati storici),
- dati fetali (vivi/morti, sesso, anomalie dei tessuti molli e anomalie scheletriche),
- dati sulla figliata (vivi/morti, sesso, anomalie dei tessuti molli e anomalie scheletriche),
- elaborazione statistica dei risultati quando possibile,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 32

SAGGIO DI CANCEROGENESI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

La sostanza da saggiare è somministrata normalmente 7 giorni per settimana, tramite via appropriata, a diversi gruppi di animali sperimentali, una dose per gruppo, per la maggior parte della loro durata di vita. Durante e dopo l'esposizione alla sostanza, gli animali verranno sottoposti giornalmente ad osservazione per individuare i sintomi della tossicità, in particolare lo sviluppo dei tumori.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nell'alloggio sperimentale e nutriti per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono randomizzati ed assegnati a gruppi stabiliti.

Animali da laboratorio

La specie preferita è il ratto. Sulla base dei risultati di studi precedentemente intrapresi, altre specie (roditori o non-roditori) possono essere utilizzate. Sarà opportuno usare ceppi di giovani animali sani generalmente utilizzati in laboratorio e il dosaggio dovrà iniziare non appena possibile dopo lo svezzamento. All'inizio dello studio, la variazione di peso degli animali usati non dovrà superare più o meno 20% del valore medio. Quando vengano intrapresi studi di subcronicità orale come preliminari ad uno studio a lungo termine, si dovranno usare le stesse specie in entrambi gli studi.

Numero e sesso

Si utilizzeranno animali di entrambi i sessi.

La somministrazione del dosaggio ai roditori dovrà cominciare non appena possibile dopo lo svezzamento.

Nel caso di roditori si utilizzeranno almeno 100 animali (50 maschi e 50 femmine) per ogni livello di dose e gruppo di controllo parallelo. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare ad intervalli alcuni animali, il numero dovrà essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio.

Livelli di dose e frequenza dell'esposizione

Si dovranno usare almeno tre livelli di dose oltre a un gruppo di controllo parallelo. Il livello di dose più elevato dovrà essere tale da provocare sintomi di tossicità minimi, quali una leggera diminuzione dell'aumento del peso corporeo (meno di 10%), senza alterare sostanzialmente la durata normale di vita per effetti diversi da quelli dei tumori.

La dose più bassa non dovrà interferire con la crescita, lo sviluppo, e la longevità normali dell'animale né produrre sintomi di tossicità. In generale, essa non dovrà essere inferiore al 10% della dose più elevata.

La (le) dose(i) intermedia(e) dovrà essere stabilita mediamente tra le dosi elevate e quelle basse.

La scelta dei livelli di dose dovrà prendere in considerazione i dati delle prove e degli studi precedenti di tossicità.

Se il prodotto chimico è somministrato in acqua potabile o mescolato nella dieta, esso dovrà essere continuamente disponibile.

Controlli

Si userà il gruppo di controllo parallelo, che è identico sotto ogni aspetto ai gruppi esposti eccezion fatta per l'esposizione alla sostanza in esame.

In circostanze specifiche, quali ad esempio gli studi di inalazione comportanti impiego di aerosol o gli studi sulla tossicità orale che contemplano l'uso di un emulsionante ad attività biologica atipica, si utilizzerà un gruppo di controllo supplementare non esposto al veicolo.

Vie di somministrazione

Le tre vie principali di somministrazione sono: orale, cutanea e per inalazione. La scelta della via di somministrazione dipende dalle caratteristiche fisiche e chimiche della sostanza da saggiare e dalla via che caratterizza l'esposizione degli esseri umani.

Saggio per via orale

Se la sostanza da saggiare è assorbita dal tratto gastrointestinale, e se la via orale è una via di esposizione degli esseri umani, verrà preferita la via orale di somministrazione, a meno che non vi siano controindicazioni. Gli animali dovranno ricevere la sostanza da saggiare nella loro dieta, sciolta in acqua potabile, o in capsula.

Il dosaggio ideale dovrebbe essere un dosaggio quotidiano sulla base di sette giorni/settimana, perché il dosaggio di cinque giorni/settimana permette il recupero o la perdita di tossicità nel periodo di mancato dosaggio, influenzando così i risultati e la valutazione successiva. Tuttavia, principalmente sulla base di considerazioni pratiche, il dosaggio di cinque giorni/settimana è considerato accettabile.

Saggio per via cutanea

L'esposizione cutanea per spennellamento della pelle può essere scelta per simulare una via principale di esposizione umana e come sistema modello per induzione di lesioni cutanee.

Saggio per via inalatoria

Poiché gli esperimenti di inalazione presentano problemi tecnici di maggior complessità delle altre vie di somministrazione, si forniscono in questa sede indicazioni particolareggiate su questo modo di somministrazione. Da notare inoltre che l'installazione endotracheale può costituire un'alternativa valida in situazioni specifiche.

Le esposizioni a lungo termine sono di solito modellate sui tipi di esposizione umana e sottopongono gli animali ad un'esposizione quotidiana di 6 ore dopo livellamento delle concentrazioni della camera, per 5 giorni/settimana (esposizione intermittente) o, per un'esposizione ambientale possibile, con 22-24 ore di esposizione/giorno, 7 giorni/settimana (esposizione continua), con circa un'ora per nutrire gli animali in orari simili ogni giorno e per il mantenimento delle camere. In entrambi i casi, gli animali di solito sono esposti ad una concentrazione fissa di sostanza da saggiare. Una differenza notevole da considerare tra l'esposizione intermittente e quella continua è costituita dal fatto che con la prima vi è un periodo di 17-18 ore in cui gli animali possono riprendersi dagli effetti di ogni esposizione, e un periodo ancora più lungo di recupero a fine settimana.

La scelta dell'esposizione intermittente o continua dipende dagli obiettivi dello studio e dall'esposizione umana da simulare. Tuttavia, occorrerà considerare alcune difficoltà tecniche. Per esempio, i vantaggi dell'esposizione continua per la simulazione delle condizioni ambientali possono essere compensati dalla necessità di abbeverare o nutrire gli animali durante l'esposizione, e dall'esigenza di usare aerosol più complicati (e affidabili), di generare il vapore e di usare tecniche di controllo.

Camere di esposizione

Gli animali dovranno essere sottoposti a prove in camere di inalazione progettate per sostenere un flusso dinamico di almeno 12 cambiamenti d'aria/ora, per assicurare un tenore di ossigeno adeguato e un'atmosfera ugualmente distribuita. Le camere di esposizione e di controllo dovranno avere costruzioni e progettazioni identiche per assicurare condizioni di esposizione comparabili sotto tutti gli aspetti, eccezion fatta per le esposizioni alle sostanze

da saggiare. Una leggera pressione negativa dentro la camera viene generalmente mantenuta per impedire perdite della sostanza sperimentale nella zona circostante. Nelle camere si dovrà ridurre al massimo l'affollamento degli animali sperimentali. Come regola generale per assicurare la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» totale degli animali sperimentali non dovrà superare il 5% del volume della camera.

Si effettueranno le seguenti misurazioni o controlli:

- i) Corrente d'aria: la portata d'aria attraverso la camera dovrà essere controllata preferibilmente in continuo.
- ii) Concentrazione: durante il periodo di esposizione quotidiana, la concentrazione non dovrà variare di più del $\pm 15\%$ dal valore medio. Per la durata totale dello studio, le concentrazioni giornaliere dovranno essere tenute costanti nella misura del possibile.
- iii) Temperatura ed umidità: per i roditori, la temperatura dovrà essere mantenuta a $22\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C})$ e l'umidità all'interno della camera al 30-70%, eccetto quando l'acqua è usata per mantenere in sospensione la sostanza sperimentale nell'atmosfera della camera. Entrambe dovranno essere controllate preferibilmente in continuo.
- iv) Misurazioni delle dimensioni delle particelle: occorrerà effettuare una determinazione della distribuzione dimensionale delle particelle nell'atmosfera delle camere in cui si usino aerosol liquidi o solidi. Le particelle degli aerosol dovranno essere di dimensioni respirabili per gli animali sperimentali usati. I campioni delle atmosfere della camera saranno prelevati nell'area di respirazione degli animali. Il campione dell'aria sarà rappresentativo della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono esposti e dovrà rappresentare, su una base gravimetrica, tutto l'aerosol sospeso anche quando gran parte dello stesso non è respirabile. Le analisi granulometriche dovranno essere effettuate di frequente durante la messa a punto del sistema di generazione per assicurare la stabilità dell'aerosol e, in seguito, durante le esposizioni, solo quando necessario, a seconda dei bisogni, per determinare l'uniformità di distribuzione delle particelle a cui gli animali sono stati esposti.

Durata dello studio

La durata di un test di cancerogenesi copre la parte principale della durata normale di vita degli animali sperimentali. La conclusione dello studio sarà dopo 18 mesi per i topi ed i criceti, e dopo 24 mesi per i ratti; tuttavia, per certi ceppi di animali con maggior longevità e tasso poco elevato di tumori spontanei, la conclusione dovrebbe essere dopo 24 mesi per i topi ed i criceti e dopo 30 mesi per i ratti. Alternativamente, la conclusione di un tale studio esteso è accettabile quando la percentuale di superstiti nel gruppo a livello di dose più basso o nel gruppo di controllo raggiunge il 25%. Allo scopo di terminare lo studio in cui si manifesti una differenza evidente nella risposta, determinata dal sesso, ciascun sesso dovrà essere considerato come un esperimento distinto. Quando solo il gruppo a dose elevata muore prematuramente per ovvie ragioni di tossicità, questa ragione non deve determinare la conclusione dell'esperimento a meno che le manifestazioni tossiche non causino problemi negli altri gruppi. Perché un risultato sperimentale negativo sia accettabile, non più del 10% di animali di qualsiasi gruppo deve essere perso a causa di autolisi, cannibalismo o altri problemi, e il tasso di sopravvivenza di tutti i gruppi non deve essere inferiore al 50% a 18 mesi per i topi ed i criceti e a 24 mesi per i ratti.

Procedimento

Osservazioni

Le osservazioni parallele includeranno modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del modello comportamentale.

L'osservazione regolare degli animali è necessaria per assicurarsi che gli stessi siano conservati il più possibile per lo studio e non persi a causa di cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Gli animali moribondi verranno rimossi e sottoposti a necropsia.

Per tutti gli animali si annoteranno i sintomi clinici e la mortalità. Si dedicherà speciale attenzione all'insorgenza dei tumori; si registrerà la data di inizio, la posizione, le dimensioni, l'aspetto e la progressione di ogni tumore grossolanamente visibile o palpabile.

Si procederà settimanalmente alla misurazione del consumo alimentare (e del consumo dell'acqua quando la sostanza sperimentale è somministrata in acqua potabile) durante le prime 13 settimane dello studio e successivamente a intervalli di circa tre mesi a meno che i cambiamenti dello stato di salute o del peso corporeo non impongano altre soluzioni.

Il peso corporeo dovrà essere registrato individualmente per tutti gli animali una volta per settimana durante le prime 13 settimane del periodo di prova ed almeno una volta ogni 4 settimane in seguito.

Esami clinici

Ematologia

Se le osservazioni parallele evidenziano un deterioramento nella salute degli animali durante lo studio, si eseguirà un conteggio differenziale del sangue degli animali colpiti.

Dopo 12 mesi, 18 mesi e prima del sacrificio, si farà uno striscio del sangue di tutti gli animali. Un conteggio differenziale del sangue sarà eseguito sui campioni ottenuti dagli animali nel gruppo a dosaggio più elevato e nei controlli. Se i suddetti dati, e in particolare quelli ottenuti prima del sacrificio, o i dati dall'esame patologico ne indicano l'esigenza, si eseguirà il conteggio differenziale del sangue anche per il gruppo(i) trattato con dosaggio immediatamente inferiore.

Esame autoptico di base

L'esame autoptico di base completo dovrà essere eseguito su tutti gli animali, compresi quelli che sono morti durante l'esperimento e quelli moribondi. Si conserveranno tutti i tumori o le lesioni visibili o sospette.

I seguenti organi e tessuti dovranno essere conservati in mezzo adatto per esami istopatologici futuri possibili: tutte le lesioni generali, cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, trachea e polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, milza, fegato, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, organi genitali accessori, pelle, esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, ghiandole mammarie femminili, muscolatura della coscia, nervo periferico, sterno con midollo osseo, femore — compresa superficie articolare, midollo spinale a tre livelli — cervicale, mediotoracico e lombare, occhi e ghiandole lacrimali esorbitali.

Sebbene l'insufflazione dei polmoni e della vescica urinaria con un fissativo sia il modo ottimale di conservare questi tessuti, l'insufflazione dei polmoni negli studi di inalazione è un requisito necessario per l'esecuzione dell'esame istopatologico appropriato. Negli studi di inalazione, si conserverà tutto il tratto respiratorio, comprese le cavità nasali, le faringi e le laringi.

Esame istopatologico

- a) Esame istopatologico completo degli organi e dei tessuti di tutti gli animali che muoiono o vengono sacrificati durante la prova e di tutti gli animali nei gruppi trattati con dose elevata e nei controlli.
- b) Esame dei tumori o lesioni grossolane visibili o sospette in tutti i gruppi.
- c) Se nei gruppi trattati con dosaggio elevato e nei gruppi di controllo si riscontra una differenza significativa nell'incidenza di lesioni neoplastiche, si eseguirà l'esame istopatologico di quell'organo o tessuto specifico negli altri gruppi.
- d) Se il tasso di sopravvivenza nel gruppo trattato con dosi elevate è significativamente inferiore a quello del gruppo di controllo, il gruppo trattato con dosaggio immediatamente inferiore dovrà essere sottoposto ad esame completo.
- e) Se nel gruppo trattato con dosi elevate si riscontra induzione di tossicità o altri effetti che potrebbero influire sulla risposta neoplastica, si effettuerà un esame completo del gruppo trattato con il dosaggio immediatamente inferiore.

2. DATI

I dati dovranno essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali che presentano tumori scoperti durante l'esperimento, la data di individuazione ed il numero di animali in cui si sono riscontrati tumori dopo l'uccisione. I risultati debbono essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.;

- condizioni sperimentali

descrizione dell'apparecchiatura di esposizione, includente:

progettazione, tipo, dimensioni, fonte di aria, sistema per generare particelle ed aerosol, metodo di condizionamento dell'aria, trattamento dell'aria di scarico, metodo di alloggiamento degli animali in una camera sperimentale quando questo sistema venga utilizzato. Descrizione del dispositivo per misurare la temperatura, l'umidità e, se del caso, la stabilità delle concentrazioni di aerosol o le dimensioni delle particelle.

Dati di esposizione: questi dovranno essere presentati in forma di tabelle con indicazione dei valori medi e una misura della variabilità (ad esempio: deviazione standard) e includeranno:

- a) portata dell'aria attraverso l'attrezzatura di inalazione,
 - b) temperatura ed umidità dell'aria,
 - c) concentrazioni nominali (quantità totale della sostanza sperimentale immessa nell'attrezzatura di inalazione divisa per il volume dell'aria),
 - d) natura del veicolo, se usato,
 - e) concentrazioni reali nella zona sperimentale di respirazione,
 - f) dimensioni delle particelle medianti (se del caso):
- livelli di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni;
 - dati di incidenza del tumore secondo il sesso, la dose e il tipo di tumore;
 - registrazione della data della morte (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione della prova;
 - dati sulla risposta tossica per sesso e per dose;
 - descrizione degli effetti tossici o di altri effetti;
 - registrazione della data di osservazione di ogni sintomo anomalo e del decorso successivo;
 - alimentazione e dati sul peso corporeo;
 - risultati dell'esame ematologico;
 - risultati dell'autopsia;
 - descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici;
 - elaborazione statistica dei risultati con descrizione dei metodi impiegati;
 - discussione dei risultati;
 - interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 33

SAGGIO COMBINATO DI TOSSICITÀ CRONICA / CANCEROGENESI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

L'obiettivo di un saggio combinato di tossicità cronica/cancerogenesi è quello di determinare gli effetti cronici e cancerogeni di una sostanza di una specie di mammifero in seguito a esposizione prolungata.

Per questo scopo, uno studio di cancerogenesi è integrato con almeno un gruppo satellite trattato e un gruppo satellite di controllo. La dose usata per il gruppo satellite a dose elevata può essere più alta di quella usata per il gruppo a dose elevata nello studio di cancerogenesi. Nello studio di cancerogenesi, gli animali sono esaminati per la tossicità in generale come pure per la risposta cancerogena. Gli animali nel gruppo satellite trattato sono esaminati per la tossicità in generale.

La sostanza in esame è somministrata normalmente 7 giorni per settimana, per una via di somministrazione appropriata, a diversi gruppi di animali da esperimento, una dose per gruppo, per la maggior parte della loro vita. Durante e dopo l'esposizione alla sostanza in esame, gli animali da esperimento vengono osservati ogni giorno per individuare i segni di tossicità e lo sviluppo di tumori.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Gli animali sono tenuti nelle condizioni di alloggio e di alimentazione del saggio per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mescolati con metodo casuale ed assegnati a gruppi.

Animali da esperimento

La specie preferita è il ratto. Sulla base dei risultati di studi precedentemente svolti, altre specie (roditori o non-roditori) possono essere utilizzate. Si dovrebbero usare i ceppi di animali giovani sani generalmente usati in laboratorio e il dosaggio dovrebbe cominciare non appena possibile dopo lo svezzamento.

All'inizio dello studio, la variazione del peso degli animali usati non dovrebbe superare il $\pm 20\%$ del valore medio. Quando venga intrapreso uno studio subcronico orale come preliminare ad uno studio a lungo termine, si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo in entrambi gli studi.

Numero e sesso

Per i roditori si dovrebbero usare almeno 100 animali (50 maschi e 50 femmine) per ciascun livello di dose e un gruppo di controllo parallelo. Le femmine dovranno essere nullipare e non gravide. Se si prevedono sacrifici intermedi, il numero dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio.

Il(i) gruppo(i) satellite(i) trattato(i) per la valutazione di patologie diverse dai tumori dovrebbe essere composto da 20 animali di ciascun sesso, mentre il gruppo di controllo satellite dovrà contenere 10 animali di ciascun sesso.

Livelli di dose e frequenza di esposizione

Per gli scopi delle prove di cancerogenesi si dovrebbero usare almeno tre livelli di dose oltre ad un gruppo di controllo parallelo. Il livello di dose più elevato dovrebbe produrre sintomi minimi di tossicità, quale un leggero calo dell'aumento del peso corporeo (meno del 10%), senza alterare sostanzialmente la durata normale di vita a causa di effetti diversi dai tumori.

Il livello di dose più basso non dovrebbe interferire con la crescita normale, lo sviluppo e la longevità dell'animale, né produrre alcuna indicazione di tossicità. Questa dose, in genere, non dovrebbe essere inferiore al 10% della dose elevata. La(e) dose(i) intermedia(e) dovrebbe(ro) essere fisata(e) in un intervallo medio compreso fra la dose elevata a quella bassa. La selezione dei livelli di dose dovrebbe tener conto dei dati derivati dai saggi e dagli studi di tossicità precedenti. Per le finalità del saggio di tossicità cronica, nel saggio vengono inclusi gruppi trattati aggiuntivi e un gruppo di controllo satellite parallelo. La dose elevata per il trattamento degli animali del gruppo satellite dovrà essere tale da produrre evidenti segni di tossicità.

La frequenza dell'esposizione è normalmente quotidiana. Se la sostanza chimica è somministrata nell'acqua da bere o mescolata nella dieta, queste dovrebbero essere continuamente disponibili.

Controlli

Si dovrebbe usare un gruppo parallelo, identico sotto tutti gli aspetti ai gruppi trattati, fatta eccezione per l'esposizione alla sostanza in esame.

In circostanze speciali, quali gli studi di inalazione comportanti l'uso di aerosol o di un emulsionante con attività biologica non caratterizzata mediante studi di tossicità orale, si dovrebbe utilizzare un gruppo di controllo complementare non esposto al veicolo.

Vie di somministrazione

Le tre vie principali di somministrazione sono: orale, cutanea e per inalazione. La scelta della via di somministrazione è funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza in esame e della più probabile via di esposizione degli esseri umani.

Saggi per via orale

Quando la sostanza in esame è assorbita dal tratto gastrointestinale e l'ingestione è una via di esposizione per gli esseri umani, si preferisce la via orale di somministrazione a meno che vi siano controindicazioni. Gli animali possono ricevere la sostanza in esame nella loro dieta, sciolta nell'acqua potabile, o somministrata in capsula.

Idealmente, si dovrebbe usare un dosaggio quotidiano sulla base di sette giorni per settimana, perché il dosaggio di cinque giorni per settimana potrebbe permettere il recupero o una tossicità da privazione nel periodo di mancato dosaggio influenzando così i risultati e la valutazione successiva. Tuttavia, principalmente sulla base di considerazioni pratiche, un dosaggio sulla base di cinque giorni per settimana è considerato accettabile.

Saggi per via cutanea

L'esposizione cutanea con spennellatura della pelle può essere scelta per simulare una principale via di esposizione umana e come sistema modello per induzione di lesioni cutanee.

Saggi per via inalatoria

Poiché i saggi inalatori presentano problemi tecnici di maggior complessità delle altre vie di somministrazione, si forniscono in questa sede indicazioni più particolareggiate su questo modo di somministrazione. Da notare inoltre che l'instillazione endotracheale può costituire un'alternativa valida in situazioni specifiche.

Le esposizioni a lungo termine sono di solito modellate su esposizione umana prevista sottoponendo gli animali ad un'esposizione quotidiana di 6 ore dopo equilibratura delle concentrazioni della camera, per 5 giorni/settimana (esposizione intermittente) o ad un'esposizione ambientale possibile, con 22-24 ore di esposizione/giorno, 7 giorni per settimana (esposizione continua), con circa un'ora per nutrire gli animali allo stesso orario e per la manutenzione della camera. In entrambi i casi, gli animali di solito sono esposti a concentrazioni fisse delle sostanze in esame. Una differenza notevole da considerare tra l'esposizione intermittente e quella continua è costituita dal fatto che con la prima vi è un periodo di 17-18 ore in cui gli animali possono riprendersi dagli effetti di ogni esposizione quotidiana, e un periodo ancora più lungo di recupero durante i fine settimana.

La scelta dell'esposizione intermittente o continua dipende dagli obiettivi dello studio e dall'esposizione umana da simulare. Tuttavia, occorrerà considerare alcune difficoltà tecniche. Per esempio, i vantaggi dell'esposizione continua per la simulazione delle condizioni ambientali possono essere controbilanciati dalla necessità di abbeverare o nutrire gli animali durante l'esposizione, e dall'esigenza di usare aerosol più complicati (e affidabili) e di sistemi di generazione del vapore e di controllo.

Camere di esposizione

Gli animali dovrebbero essere sottoposti a sperimentazione in camere di inalazione progettate per sostenere un flusso dinamico di almeno 12 cambiamenti d'aria/ora, per assicurare un tenore di ossigeno adeguato e un'atmosfera di esposizione uniforme. Le camere di esposizione e di controllo dovrebbero essere identiche nella costruzione e progettazione per assicurare condizioni di esposizione comparabili sotto tutti gli aspetti, eccezion fatta per le esposizioni alle sostanze in esame. Una leggera depressione viene generalmente mantenuta dentro la camera per impedire perdite della sostanza in esame nella zona circostante. Nelle camere si dovrebbe ridurre al massimo l'affollamento degli animali di saggio. Come regola generale per assicurare la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» totale degli animali di saggio non dovrebbe superare il 5% del volume della camera.

Si dovrebbero effettuare le seguenti misurazioni o controlli:

- i) Flusso dell'aria: la velocità del flusso dell'aria attraverso la camera dovrebbe essere controllata preferibilmente in modo continuo.
- ii) Concentrazione: durante il periodo di esposizione quotidiana, la concentrazione non dovrebbe variare più del $\pm 15\%$ dal valore medio. Per la durata totale dello studio, le concentrazioni giornaliere dovranno essere tenute costanti nella misura del possibile.
- iii) Temperatura ed umidità: per i roditori, la temperatura dovrà essere mantenuta a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e l'umidità all'interno della camera al 30-70%, eccetto quando l'acqua è usata per mantenere in sospensione la sostanza sperimentale nell'atmosfera della camera. Entrambe dovrebbero essere controllate preferibilmente in continuo.
- iv) Misura delle dimensioni delle particelle: la distribuzione delle dimensioni delle particelle dovrebbe essere determinata sulle atmosfere di camere che contengono aerosol liquidi o solidi. Le particelle contenute negli aerosol dovrebbero avere dimensioni tali da essere inalabili dall'animale da laboratorio usato. I campioni di atmosfera dovrebbero essere prelevati a livello della zona di respirazione degli animali. Il campione d'aria dovrebbe essere rappresentativo della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono esposti e dovrebbe rappresentare, su una base gravimetrica, tutto l'aerosol sospeso anche quando gran parte di esso non è respirabile. Le analisi della grandezza delle particelle dovrebbero essere effettuate spesso durante la messa a punto del sistema di generazione per assicurare la stabilità dell'aerosol e, in seguito, quando si ritenga necessario, durante le esposizioni, per determinare in modo adeguato l'uniformità della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono stati esposti.

Durata dello studio

La durata della parte del saggio relativa alla cancerogenesi comprende la maggior parte della vita normale degli animali di saggio. La conclusione del saggio dovrebbe essere a 18 mesi per i topi ed i criceti e dopo 24 mesi per i ratti; tuttavia, per certi ceppi di animali con maggior longevità e/o tasso poco elevato di tumori spontanei, la conclusione dovrebbe essere dopo 24 mesi per i topi ed i criceti e dopo 30 mesi per i ratti. Alternativamente, la conclusione di un tale studio esteso è accettabile quando la percentuale di superstiti nel gruppo a livello di dose più basso o nel gruppo di controllo raggiunge il 25%. Quando si conclude uno studio in cui si manifesti una differenza evidente nella risposta determinata del sesso, ciascun sesso dovrebbe essere considerato separatamente. Quando solo il gruppo a dose elevata muore prematuramente per ovvie ragioni di tossicità, ciò non deve necessariamente determinare la conclusione dell'esperimento purché le manifestazioni tossiche non causino problemi negli altri gruppi. Perché un risultato sperimentale negativo sia accettabile, non più del 10% di animali di qualsiasi gruppo può essere perso nell'esperimento a causa di autolisi, cannibalismo o altri problemi, e il tasso di sopravvivenza di tutti i gruppi non deve essere inferiore al 50% a 18 mesi per i topi ed i criceti e a 24 mesi per i ratti.

I gruppi satelliti di 20 animali (per sesso) sottoposti a dosaggio e i 10 animali (per sesso) di controllo associati, usati per la prova di tossicità cronica, dovrebbero essere mantenuti ai fini dello studio per almeno 12 mesi. Questi animali dovrebbero essere destinati al sacrificio ai fini di un esame della patologia connessa con la sostanza sperimentale non complicata da mutamenti geriatrici.

Procedimento

Osservazioni

Quotidianamente si dovrebbero effettuare osservazioni cliniche che includeranno i mutamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle membrane mucose nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del modello comportamentale.

Un esame clinico dovrebbe essere effettuato a intervalli appropriati sugli animali del(dei) gruppo(i) satellite(i) trattato(i).

Osservazioni regolari degli animali sono necessarie per assicurarsi, per quanto possibile, che gli stessi non siano persi dallo studio a cause quali cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necropsia.

Per tutti gli animali si dovrebbero registrare i segni clinici, inclusi i mutamenti neurologici ed oculari nonché la mortalità. Si deve dedicare particolare attenzione allo sviluppo dei tumori; il momento di insorgenza e la progressione delle condizioni tossiche dovrebbero essere registrati.

Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misurazione del consumo alimentare (e del consumo dell'acqua quando la sostanza in esame è somministrata in tale veicolo) durante le prime 13 settimane dello studio e poi a intervalli di circa tre mesi a meno che i mutamenti dello stato di salute o del peso corporeo non impongano altre soluzioni.

Il peso corporeo dovrebbe essere registrato individualmente per tutti gli animali una volta per settimana durante le prime 13 settimane del periodo di saggio ed almeno una volta ogni 4 settimane in seguito.

Esami clinici

Ematologia

L'esame ematologico (ad esempio: contenuto dell'emoglobina, volume delle cellule impaccate, globuli rossi totali, globuli bianchi totali, piastrine o altre misure del potenziale di coagulazione) dovrebbe essere eseguito dopo 3 mesi, 6 mesi ed approssimativamente a intervalli successivi di 6 mesi ed alla conclusione, sui campioni di sangue raccolti da 10 ratti per sesso di tutti i gruppi. Se possibile, i campioni dovrebbero essere prelevati dagli stessi ratti a ogni intervallo.

Se le osservazioni cliniche suggeriscono un peggioramento nella salute degli animali durante lo studio, si dovrebbe eseguire un conteggio differenziale ematico degli animali colpiti.

Un conteggio differenziale ematico viene eseguito sui campioni provenienti dagli animali appartenenti al gruppo a più elevato dosaggio e nei controlli. I conteggi differenziali del sangue sono eseguiti sul gruppo(i) a dosaggio inferiore immediatamente successivo soltanto se si riscontra una discrepanza notevole tra il gruppo a dosaggio più elevato ed i controlli, o se i risultati dell'esame patologico ne indicano l'esigenza.

Analisi delle urine

Si dovrebbero raccogliere per analisi i campioni di urina di 10 ratti per sesso per tutti i gruppi, se possibile agli stessi intervalli dell'esame ematologico. Le seguenti determinazioni dovrebbero essere fatte o a partire dai diversi animali o su un campione miscelato sesso/gruppo per i roditori:

- aspetto: volume e densità per i singoli animali;
- proteina, glucosio, chetoni, sangue occulto (semiquantitativamente);
- microscopia del deposito (semiquantitativamente).

Chimica clinica

Approssimativamente a intervalli di 6 mesi, ed alla conclusione, si prelevano campioni di sangue per le misure di chimica clinica da tutti i non-roditori e da 10 ratti per sesso di tutti i gruppi, se possibile dagli stessi ratti a ogni intervallo. Inoltre, si dovrebbe prelevare un campione prima del saggio dai non-roditori. Il plasma viene preparato da questi campioni e vengono fatte le seguenti determinazioni:

- concentrazione proteina totale;
- concentrazione dell'albumina;
- saggi di funzionalità epatica (come attività fosfatasi alcalina, glutammico-piruvico-transaminasi ⁽¹⁾, glutammico-ossalacetico-transaminasi ⁽²⁾) gamma-glutamyl transpeptidasi, ornitina decarbossilasi;
- metabolismo dei carboidrati, come glucosio ematico a digiuno;
- saggi di funzionalità renale come azoto ureico.

⁽¹⁾ Ora noto come alanina aminotransferasi serica.

⁽²⁾ Ora nota come aspartato aminotransferasi serica.

Necropsia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti ad esame necroscopico completo, compresi quelli che sono morti durante l'esperimento a quelli sacrificati perché moribondi. Prima del sacrificio si dovrebbero prelevare campioni di sangue da tutti gli animali per i conteggi differenziali ematici. Si dovrebbero conservare tutte le lesioni e i tumori grossolanamente visibili o sospetti. Si dovrebbe cercare di correlare le osservazioni macroscopiche con i risultati microscopici.

Tutti gli organi e i tessuti dovrebbero essere conservati per l'esame istopatologico. Questo di solito riguarda i seguenti organi e tessuti: cervello ⁽¹⁾ (midollo/ponte, corteccia cerebellare, corteccia cerebrale), pituitaria, tiroide (compresa paratiroide), timo, polmoni (trachea compresa), cuore, aorta, ghiandole salivari, fegato ⁽¹⁾, milza, reni ⁽¹⁾ ghiandole surrenali ⁽¹⁾, esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, utero, vescica urinaria, linfonodi, pancreas, gonadi ⁽¹⁾, organi genitali accessori, ghiandole mammarie femminili, pelle, muscolatura, nervo periferico, midollo spinale (cervicale, toracico, lombare), sterno con midollo osseo e femore (articolazione compresa) e occhi. Sebbene l'insufflazione dei polmoni e della vescica urinaria con un fissativo sia il modo ottimale di conservare questi tessuti, l'insufflazione dei polmoni negli studi di inalazione è un requisito essenziale per l'esame istopatologico appropriato. In studi speciali come quelli dell'inalazione, si dovrebbero studiare tutte le vie respiratorie, compreso naso, faringe e laringe.

Se si eseguono altri esami clinici, le informazioni ottenute con queste procedure dovrebbero essere rese disponibili prima dell'esame microscopico, perché possono fornire indicazioni significative al patologo.

Istopatologia

Per la parte di saggio riguardante la tossicità cronica

Esame particolareggiato da effettuarsi su tutti gli organi conservati di tutti gli animali appartenenti al gruppo satellite trattato con dose elevata e al gruppo di controllo. Quando si riscontra una patologia correlata con la sostanza in esame nel gruppo satellite trattato con dose elevata, gli organi-bersaglio di tutti gli altri animali in un qualsiasi altro gruppo satellite trattato dovrebbero essere sottoposti ad esame istologico completo e particolareggiato insieme con quelli dei gruppi trattati nella parte di cancerogenesi dello studio alla sua conclusione.

Per la parte di saggio riguardante la cancerogenesi

- a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sugli organi e tessuti di tutti gli animali che muoiono o che vengono uccisi durante la prova e di tutti gli animali dei gruppi trattati con dose elevata e del gruppo di controllo;
- b) tutti i tumori visibili macroscopicamente o le lesioni sospette di essere di origine tumorali, che si riscontrano in qualsiasi organo di tutti i gruppi di animali dovrebbero essere esaminati microscopicamente;
- c) se si riscontra una differenza significativa nell'incidenza delle lesioni neoplastiche nei gruppi di controllo e in quello trattato con dose elevata, si dovrebbe effettuare l'esame istopatologico su quel particolare organo o tessuto, negli altri gruppi;
- d) se la sopravvivenza nel gruppo trattato con dose elevata è significativamente inferiore a quella del gruppo di controllo, si dovrebbe effettuare un esame completo del gruppo trattato con il dosaggio immediatamente inferiore;
- e) quando si riscontra un'evidenza nel gruppo a dosaggio elevato di induzione di effetti tossici o altri effetti che potrebbero influire su una risposta neoplastica, si dovrebbe procedere ad un esame completo del gruppo trattato con il dosaggio immediatamente inferiore.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali che presentano tumori o effetti tossici riscontrati durante il saggio, il tempo di individuazione ed il numero di animali in cui sono stati individuati tumori dopo il sacrificio. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico appropriato. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.;

⁽¹⁾ Questi organi, provenienti da 10 animali per sesso e per gruppo (per i roditori) dovrebbero essere pesati.

— condizioni sperimentali:

descrizione dell'apparecchiatura di esposizione, includente:

progettazione, tipo, dimensioni, sorgente d'aria, sistema per generare particelle ed aerosol, metodo di condizionamento dell'aria, trattamento dell'aria di scarico, metodo di alloggiamento degli animali in una camera di saggio quando questa venga utilizzata. Il dispositivo per misurare la temperatura, l'umidità e, se del caso, la stabilità delle concentrazioni di aerosol o le dimensioni delle particelle.

dati di esposizione:

questi dovranno essere presentati in forma tabulare con indicazione dei valori medi e una misura della variabilità (ad esempio: deviazione standard) ed includere:

- a) velocità dei flussi dell'aria attraverso l'attrezzatura di inalazione,
- b) temperature ed umidità dell'aria,
- c) concentrazioni nominali (quantità totale della sostanza di saggio immessa nell'attrezzatura di inalazione divisa per il volume dell'aria),
- d) natura di veicolo, se usato,
- e) concentrazioni reali nella zona sperimentale di respirazione,
- f) dimensioni mediane delle particelle (se del caso);

— livelli di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni;

— dati di incidenza dei tumori secondo il sesso, la dose e il tipo di tumore;

— registrazione del tempo degli eventi letali (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali siano sopravvissuti fino alla conclusione del saggio, incluso gruppo satellite;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose;

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti;

— registrazione della data di osservazione di ogni sintomo anomalo e del decorso successivo;

— risultati oftalmologici;

— dati su alimentazione e peso corporeo;

— risultati dell'esame ematologico;

— risultati degli esami di biochimica clinica (inclusa qualsiasi analisi delle urine);

— risultati dell'esame necroscopico;

— descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici;

— elaborazione statistica dei risultati con descrizione dei metodi impiegati;

— discussione dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 34

SAGGIO DI TOSSICITÀ SULLA RIPRODUZIONE: UNA GENERAZIONE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanza di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La sostanza sperimentale è somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di animali maschi e femmine. I maschi dovrebbero essere sottoposti a dosaggio durante la crescita e per almeno un ciclo spermatogenico completo (approssimativamente 56 giorni per il topo e 70 giorni per il ratto) per provocare qualsiasi tipo di effetto avverso da parte della sostanza di saggio sulla spermatogenesi.

Le femmine della generazione P dovrebbero essere sottoposte a dosaggio per almeno due cicli estrali completi per suscitare qualsiasi tipo di effetto contrario della sostanza in esame sull'estro. Gli animali sono poi accoppiati. La sostanza in esame viene somministrata ad entrambi i sessi durante il periodo di accoppiamento ed in seguito soltanto alle femmine durante la gravidanza e per la durata del periodo di allattamento. Per la somministrazione della sostanza in esame per via inalatoria, il metodo richiederà modifiche.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Prima del saggio gli animali giovani e sani sono mescolati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi trattati e di controllo. Gli animali sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento e nutrizione per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova. Si raccomanda di somministrare la sostanza in esame nella dieta o nell'acqua da bere. Sono accettabili anche altre vie di somministrazione. Il dosaggio per tutti gli animali dovrebbe essere fatto con lo stesso metodo durante l'appropriato periodo dell'esperimento. Se un veicolo od altri additivi sono utilizzati per facilitare il dosaggio, essi non dovranno notoriamente produrre effetti tossici. Il dosaggio dovrà essere fatto su una base di sette giorni per settimana.

Animali da esperimento

Scelta della specie

Il ratto o il topo sono le specie preferite. Si dovrebbero utilizzare animali sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Non si dovrebbero utilizzare ceppi a bassa fecondità. Gli animali di saggio dovrebbero essere caratterizzati quanto alle specie, al ceppo, al sesso, al peso e all'età.

Per una valutazione adeguata della fertilità, si dovrebbero studiare sia i maschi sia le femmine. Tutti gli animali per il saggio e i controlli dovrebbero essere svezzati prima dell'inizio del dosaggio.

Numero e sesso

Ogni gruppo trattato e di controllo dovrebbe contenere un numero sufficiente di animali per avere circa 20 femmine incinte prossime a partorire o quasi al termine della gravidanza.

L'obiettivo è di avere sufficienti gravidanze e figliate per assicurare una valutazione significativa del potenziale della sostanza di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza e sul comportamento materno negli animali della generazione P, e sul lattante, sulla crescita e sullo sviluppo della figliata F₁ dal concepimento allo svezzamento.

Condizioni di saggio

Il cibo e l'acqua dovrebbero essere forniti ad libitum. Nell'imminenza del parto, le femmine incinte dovrebbero essere messe in gabbie separate o in gabbie apposite per il parto e possono essere rifornite di materiale per la costruzione della tana.

Livelli di dose

Si dovrebbero usare almeno tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo. Se si usa un veicolo per la somministrazione della sostanza in esame, il gruppo di controllo dovrebbe ricevere il veicolo al livello di dose più alto usato. Se una sostanza in esame provoca una riduzione dell'ingestione o dell'utilizzazione della dieta, si potrebbe considerare necessario l'uso di un gruppo di controllo parallelo. Idealmente, a meno che non sia limitato dalla natura fisico/chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato dovrebbe indurre effetti tossici, ma non mortalità nei genitori P. La(e) dose(i) intermedia(e) dovrebbe indurre effetti tossici minimi attribuibili alla sostanza in esame e la dose più bassa non dovrebbe indurre alcun effetto osservabile sui genitori o sulla prole. Quando somministrato con sonda o in capsula, il dosaggio di ogni animale dovrebbe essere basato sul peso corporeo del singolo animale e regolato settimanalmente per tener conto dei cambiamenti del peso corporeo. Per le femmine gravide, i dosaggi possono essere basati sul peso corporeo nel giorno 0 o al 6° giorno di gravidanza.

Saggio limite

Nel caso di sostanze a bassa tossicità, se un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg non produce evidenza di interferenza con la funzione riproduttiva, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari. Se uno studio preliminare con un livello di dose elevato, con evidenza precisa di tossicità materna, non evidenzia effetti avversi sulla fertilità, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari.

Svolgimento del saggio

Programmi sperimentali

Il dosaggio giornaliero dei genitori maschi P dovrebbe cominciare a circa cinque-nove settimane di età, dopo svezzamento e acclimatazione per almeno 5 giorni. Nei ratti, il dosaggio viene continuato per dieci settimane prima del periodo di accoppiamento (per i topi, otto settimane). I maschi dovrebbero essere sacrificati ed esaminati sia alla fine del periodo di accoppiamento oppure, alternativamente, essi possono essere mantenuti con la dieta sperimentale per la possibile produzione di una seconda figliata e dovrebbero essere sacrificati un po' prima della fine dello studio. Per le femmine genitrici P il dosaggio dovrebbe cominciare dopo almeno 5 giorni di acclimatazione e continuare per almeno due settimane prima dell'accoppiamento. Il dosaggio giornaliero delle femmine P dovrebbe continuare durante il periodo di accoppiamento di tre settimane, la gravidanza e fino allo svezzamento della prole F₁. Si dovrebbe dare attenzione a modifiche del programma di dosaggio sulla base di altre informazioni disponibili sulla sostanza in esame, quali l'induzione del suo metabolismo o bioaccumulazione.

Procedura di accoppiamento

Negli studi degli effetti tossici sulla riproduzione si possono usare i seguenti sistemi di accoppiamento: 1:1 (un maschio e una femmina), oppure 1:2 (un maschio e due femmine).

Usando il sistema di accoppiamento 1:1 si dovrebbe mettere una femmina con lo stesso maschio finché la femmina non rimanga gravida o finché non siano trascorse tre settimane. Ogni mattina le femmine dovrebbero essere esaminate per la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 di gravidanza è definito come il giorno in cui si trova un tappo vaginale oppure lo sperma.

Le coppie che non riescono ad accoppiarsi dovrebbero essere studiate per determinare la causa della sterilità apparente. Questo può comportare procedure quali, ad esempio, quella di fornire opportunità supplementari di accoppiamento con altri maschi o femmine provati, esame microscopico degli organi riproduttori, e esame del ciclo estrale o della spermatogenesi.

Dimensioni della figliata

Gli animali sottoposti a dosaggio durante lo studio di fertilità vengono lasciati partorire normalmente ed allevare liberamente la prole fino alla fase di svezzamento.

Se si effettua una standardizzazione si suggerisce la seguente procedura. Tra il 1° ed il 4° giorno dopo la nascita, la dimensione di ogni figliata può essere regolata eliminando i piccoli in più, in modo da avere, nella misura del possibile, quattro maschi e quattro femmine per figliata.

Ogni volta che il numero di maschi o di femmine non permette di avere quattro animali di ogni sesso per figliata, è accettabile una regolazione parziale (per esempio, cinque maschi e tre femmine). La standardizzazione non è applicabile alle figliate di meno di otto piccoli.

Osservazioni

Durante tutto il periodo di saggio, ogni animale dovrebbe essere sottoposto ad osservazione almeno una volta al giorno. Si dovrebbero registrare tutte le variazioni comportamentali pertinenti, i segni di parto difficile o prolungato, e tutti i sintomi di tossicità, compresa la mortalità. Nei periodi precedenti e durante l'accoppiamento, il consumo alimentare può essere misurato quotidianamente. Dopo il parto e durante l'allattamento, le misurazioni del consumo di alimento (e del consumo dell'acqua quando la sostanza sperimentale è somministrata in acqua potabile) dovrebbero essere effettuate nello stesso giorno della pesatura delle figliate. I maschi e le femmine P dovrebbero essere pesati nel primo giorno del dosaggio e in seguito settimanalmente. Queste osservazioni dovrebbero essere registrate individualmente per ogni animale adulto.

La durata della gestazione dovrebbe essere calcolata dal giorno 0 di gravidanza. Ogni figliata dovrebbe essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero ed il sesso dei piccoli, dei nati morti, dei nati vivi e la presenza di grosse anomalie.

I piccolo morti e quelli sacrificati al 4° giorno dovrebbero essere conservati e studiati per la constatazione di possibili difetti.

I piccoli vivi dovrebbero essere contati e le figliate pesate al mattino dopo la nascita, al 4° giorno e al 7° e settimanalmente fino alla conclusione dello studio, quando gli animali dovrebbero essere pesati individualmente. Le anomalie fisiche o comportamentali osservate nei ceppi o nella prole dovrebbero essere registrate.

Patologia

Necropsia

Al momento del sacrificio o della morte durante lo studio, gli animali della generazione P dovrebbero essere esaminati macroscopicamente per l'individuazione di tutte le anomalie strutturali o mutamenti patologici, prestando particolare attenzione agli organi del sistema riproduttivo. I piccolo morti o moribondi dovrebbero essere esaminati per individuare eventuali difetti.

Istopatologia

Le ovaie, l'utero, il collo dell'utero, la vagina, i testicoli, l'epididimo, le vescichette seminali, la prostata, la ghiandola della coagulazione, la ghiandola pituitaria e l'organo(i)-bersaglio di tutti gli animali P dovrebbero essere conservati per l'esame microscopico. Nel caso in cui questi organi non siano stati esaminati in altri studi con dosi multiple, essi dovrebbero essere esaminati microscopicamente in tutti gli animali dei gruppi trattati con dose elevata e di controllo e negli animali che muoiono durante l'esperimento, quando fattibile.

Gli organi di questi animali che mostrano anomalie dovrebbero quindi essere esaminati in tutti gli altri animali P. In questi casi, si dovrebbe eseguire l'esame microscopico di tutti i tessuti che mostrano alterazioni patologiche macroscopiche. Come suggerito per le procedure di accoppiamento, gli organi riproduttivi degli animali sospetti di sterilità possono essere sottoposti all'esame microscopico.

2. DATI

I dati possono essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di maschi fertili, il numero di femmine incinte, i tipi di cambiamenti e la percentuale degli animali che mostrano ciascun tipo di cambiamento. Quando possibile, i risultati numerici dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico generalmente riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie/ceppo usato,
- dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, compresa la fertilità, la gestazione normale e la vitalità,

- tempo di morte durante lo studio o, se gli animali sono sopravvissuti fino al tempo previsto per il sacrificio, alla conclusione dello studio,
- tabella indicante i pesi di ogni figliata, il peso medio dei piccoli ed i pesi individuali dei piccoli a termine,
- effetti tossici o altri effetti sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale,
- data di osservazione di ogni segno anomalo e decorso successivo,
- dati sul peso corporeo degli animali P,
- risultati della microscopia,
- descrizione particolareggiata di tutti i risultati degli esami microscopici,
- elaborazione statistica dei risultati, quando appropriata,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 35

SAGGIO DI TOSSICITÀ SULLA RIPRODUZIONE: DUE GENERAZIONI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La sostanza in esame è somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di animali maschi e femmine. I maschi della generazione P dovrebbero essere sottoposti a dosaggio durante la crescita per almeno un ciclo spermatogenico completo (approssimativamente 56 giorni nel topo e 70 giorni nel ratto) affinché la sostanza in esame provochi ogni effetto contrario sulla spermatogenesi.

Le femmine della generazione P dovrebbero essere dosate per almeno due cicli estrali completi perché la sostanza in esame provochi ogni effetto contrario sull'estro. Allo svezzamento, la somministrazione della sostanza viene continuata sulla prole F₁ durante la crescita fino all'età adulta, durante l'accoppiamento e la produzione di una generazione F₂, e finché la generazione F₂ sia svezzata. Per la somministrazione per inalazione della sostanza sperimentale, il metodo richiederà modifiche.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Prima della prova, gli animali sani sono mescolati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi trattati e di controllo. Gli animali genitori P sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento e nutrizione per almeno 5 giorni prima della prova. Si raccomanda di somministrare la sostanza in esame nella dieta o nell'acqua da bere. Sono accettabili anche altre vie di somministrazione. Tutti gli animali dovrebbero essere dosati con lo stesso metodo durante l'intero periodo sperimentale. Se un veicolo od altri additivi sono utilizzati per facilitare il dosaggio, essi non dovrebbero notoriamente produrre effetti tossici. Il dosaggio dovrebbe essere effettuato su una base di sette giorni per settimana.

Animali da esperimento: scelta della specie

Il ratto o il topo sono le specie preferite. Si dovrebbero usare animali sani P, non sottoposti a esperimenti in precedenza. Non si dovrebbero usare ceppi a bassa fecondità. Gli animali da laboratorio dovrebbero essere caratterizzati quanto alla specie, al ceppo, al sesso, al peso e/o all'età.

Per un'adeguata valutazione della fertilità, si dovrebbero studiare sia i maschi che le femmine. Tutti gli animali del gruppo di saggio e di quello di controllo dovrebbero essere svezzati prima dell'inizio del dosaggio.

Numero e sesso

Ogni gruppo di saggio e di controllo dovrebbe contenere un numero sufficiente di animali perché vi siano circa 20 femmine incinte o al termine della gravidanza. L'obiettivo è di avere sufficienti gravidanze e prole per assicurare una valutazione significativa del potenziale della sostanza di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza,

sul comportamento materno e sul lattante, sulla crescita e sullo sviluppo della prole F₁, dal concepimento alla maturità, e lo sviluppo della loro prole F₂ fino allo svezzamento.

Condizioni sperimentali

Il cibo e l'acqua dovrebbero essere forniti ad libitum. Nell'imminenza del parto, le femmine incinte dovrebbero essere messe in gabbie separate o in gabbie apposite per il parto e possono essere rifornite di materiale per la costruzione della tana.

Livelli di dose

Si dovrebbero usare almeno tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo. Se si usa un veicolo per la somministrazione della sostanza in esame, il gruppo di controllo dovrebbe ricevere il veicolo al livello di dose più elevato usato. Se una sostanza in esame produce una riduzione dell'ingestione o dell'utilizzazione della dieta, si potrebbe considerare necessario l'uso di un gruppo di controllo parallelo. Idealmente, a meno che non sia limitato dalla natura fisico/chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato dovrebbe indurre effetti tossici, ma non mortalità nei genitori P. La dose(i) intermedia(e) dovrebbe(ro) indurre effetti tossici minimi attribuibili alla sostanza di saggio e la dose più bassa non dovrebbe indurre effetti contrari osservabili sui genitori o sulla prole. Quando somministrato con sonda o in capsula, il dosaggio di ogni animale dovrebbe essere basato sul peso corporeo del singolo animale e regolato settimanalmente per tener conto dei cambiamenti del peso corporeo. Per le femmine gravide, i dosaggi possono essere basati sul peso corporeo al giorno 0 o al 6° giorno di gravidanza, se lo si desidera.

Saggio limite

Nei casi di sostanze e bassa tossicità, se un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg non produce sintomi di interferenza con la funzione riproduttiva, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari. Se uno studio preliminare con un livello di dose elevato, con evidenza precisa di tossicità materna, non evidenzia effetti avversi sulla fertilità, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari.

Svolgimento del saggio

Programmi sperimentali

Il dosaggio giornaliero dei genitori maschi P dovrebbe cominciare a circa cinque-nove settimane di età, dopo svezzamento e acclimatazione per almeno 5 giorni. Nei ratti, il dosaggio viene continuato per dieci settimane prima del periodo di accoppiamento (per i topi, otto settimane). I maschi dovrebbero essere sacrificati ed esaminati sia alla fine del periodo di accoppiamento oppure, alternativamente, essi possono essere mantenuti con la dieta sperimentale per la possibile produzione di una seconda figliata e dovrebbero essere sacrificati ed esaminati un po' prima della fine dello studio. Per le femmine genitrici P il dosaggio dovrebbe cominciare dopo almeno 5 giorni di acclimatazione e continuare per almeno due settimane prima dell'accoppiamento. Il dosaggio giornaliero delle femmine P dovrebbe continuare durante il periodo di accoppiamento di tre settimane, la gravidanza e fino allo svezzamento della prole F₁. Si dovrebbe porre attenzione a modifiche del programma di dosaggio sulla base di altre informazioni disponibili sulla sostanza in esame, quali l'induzione del suo metabolismo o bioaccumulazione.

Il dosaggio degli animali F₁ comincia allo svezzamento e termina quando essi vengono sacrificati.

Procedura di accoppiamento

Negli studi degli effetti tossici sulla riproduzione si possono usare i seguenti sistemi di accoppiamento: 1:1 (un maschio e una femmina), oppure 1:2 (un maschio e due femmine).

Usando il sistema di accoppiamento 1:1 si dovrebbe mettere una femmina con lo stesso maschio finché la femmina non rimanga gravida o finché non siano trascorse tre settimane. Ogni mattina le femmine dovrebbero essere esaminate per la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 di gravidanza è definito come il giorno in cui si trova un tappo vaginale oppure lo sperma.

Tenendo conto della spermatogenesi, la prole F₁ non dovrebbe essere accoppiata fino all'età di almeno 11 settimane per i topi, e di 13 settimane per i ratti. Per l'accoppiamento della prole F₁, un maschio ed una femmina sono scelti con metodo casuale tra ogni figliata per accoppiamento incrociato con un animale di un'altra figliata dello stesso gruppo di dosaggio, per produrre la generazione F₂. I maschi e le femmine F₁ non scelti per l'accoppiamento sono sacrificati allo svezzamento.

Le coppie che non riescono ad accoppiarsi dovrebbero essere studiate per determinare la causa della sterilità apparente. Questo può comportare procedure quali, ad esempio, quella di fornire opportunità supplementari di accoppiamento con altri maschi o femmine provati, esame microscopico degli organi riproduttivi, e esame del ciclo estrale o della spermatogenesi.

Dimensioni della figliata

Gli animali sottoposti a dosaggio durante lo studio di fertilità vengono lasciati partorire normalmente ed allevare liberamente la prole fino alla fase di svezzamento.

Se si effettua una standardizzazione, si suggerisce la seguente procedura. Tra il 1° ed il 4° giorno dopo la nascita, la dimensione di ogni figliata può essere regolata eliminando i piccoli in più, in modo da avere, nella misura del possibile quattro maschi e quattro femmine per figliata.

Ogni volta che il numero di maschi o di femmine non permette di avere quattro animali di ogni sesso per figliata, è accettabile una regolazione parziale (per esempio, cinque maschi e tre femmine). La normalizzazione non è applicabile alle figliate di meno di otto piccoli. La standardizzazione delle figliate F_2 è condotta nello stesso modo.

Osservazioni

Durante tutto il periodo di saggio, ogni animale dovrebbe essere sottoposto ad osservazione almeno una volta al giorno. Si dovrebbero registrare tutte le variazioni comportamentali pertinenti, i segni di parto difficile o prolungato, e tutti i sintomi di tossicità, compresa la mortalità. Nei periodi precedenti e durante l'accoppiamento, il consumo alimentare può essere misurato settimanalmente. A scelta, il consumo alimentare durante la gravidanza potrà essere misurato ogni giorno. Dopo il parto e durante la lattazione, le misurazioni del consumo di alimento dovrebbero essere effettuate nello stesso giorno della pesatura delle figliate. Gli animali genitori (P ed F_1) dovrebbero essere pesati nel primo giorno del dosaggio e in seguito settimanalmente. Queste osservazioni dovrebbero essere registrate individualmente per ogni animale adulto.

La durata della gestazione dovrebbe essere calcolata dal giorno 0 di gravidanza. Ogni figliata dovrebbe essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero ed il sesso dei piccoli, dei nati morti, dei nati vivi e la presenza di grosse anomalie. I piccoli morti e quelli sacrificati al 4° giorno dovrebbe essere conservati per la constatazione di possibili difetti.

Si dovrebbero contare i nati vivi e procedere alla pesatura delle figliate il mattino dopo la nascita, poi il 4° e il 7° giorno e quindi settimanalmente fino al termine dell'esperimento quando gli animali dovrebbero essere pesati individualmente. Si dovrebbero registrare le anomalie comportamentali delle genitrici e della prole.

Patologia

Necropsopia

Tutti gli animali adulti P ed F_1 dovrebbero essere sacrificati quando non più necessari per valutare gli effetti riproduttivi. La prole F_1 non selezionata per l'accoppiamento e tutta la prole F_2 dovrebbe essere sacrificata una volta svezzata.

Al momento del sacrificio o della morte durante lo studio, tutti gli animali genitori (P ed F_1) dovrebbero essere esaminati microscopicamente per l'individuazione di tutte le anomalie strutturali o le mutazioni patologiche, dedicando particolare attenzione agli organi del sistema riproduttivo. I piccoli morti o moribondi dovrebbero essere esaminati per individuare eventuali anomalie.

Istopatologia

Le ovaie, l'utero, il collo dell'utero, la vagina, i testicoli, l'epididimo, le vescichette seminali, la prostata, la ghiandola della coagulazione, la ghiandola pituitaria e l'organo(i)-bersaglio di tutti gli animali P dovrebbero essere conservati per l'esame microscopico. Nel caso in cui questi organi non siano stati esaminati in altri studi con dosi multiple, essi dovrebbero essere esaminati microscopicamente in tutti gli animali dei gruppi trattati con dose elevata e di controllo e negli animali che muoiono durante l'esperimento, quando fattibile. Gli organi che mostrano anomalie in questi animali dovrebbero quindi essere esaminati in tutti gli altri gruppi di dose. In questi casi, si dovrebbe eseguire l'esame microscopico di tutti i tessuti che mostrano alterazioni patologiche macroscopiche. Come suggerito per le procedure di accoppiamento, gli organi riproduttivi degli animali sospetti di sterilità possono essere sottoposti all'esame microscopico.

2. DATI

Elaborazione dei risultati

I dati possono essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali gravidi, i tipi di cambiamenti e la percentuale degli animali che mostrano ciascun tipo di cambiamento.

Quando possibile, i risultati numerici dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico generalmente accettato può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie/ ceppo usato,
- dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, inclusi gli indici di fertilità, gestazione e vitalità,
- tempo di morte durante lo studio o se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione dello studio,
- tabella indicante i pesi di ogni figliata, il peso medio dei piccoli ed i pesi individuali dei piccoli a termine,
- effetti tossici o altri effetti sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale,
- data di osservazione di ogni segno anomalo e decorso successivo,
- dati sul peso corporeo degli animali P e F₁,
- risultati della microscopia,
- descrizione particolareggiata di tutti i risultati degli esami microscopici,
- elaborazione statistica dei risultati, quando appropriata,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

B. 36
TOSSICOCINETICA

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Si somministra la sostanza in esame per una via appropriata. In relazione agli obiettivi dello studio, la sostanza può essere somministrata, in dose singola o in dosi ripetute nel corso di periodi di tempo definiti, a uno o più gruppi di animali da esperimento. Successivamente, in relazione al tipo di studio effettuato, si determinano la sostanza e/o i suoi metaboliti nei fluidi corporei e nei tessuti e/o negli escreti.

Gli studi possono essere effettuati con forme «non marcate» o «marcate» delle sostanze in esame. Quando è fatto uso di un marcatore, è opportuno che esso sia collocato nella sostanza in maniera tale da fornire la maggior quantità possibile di informazioni sul destino del composto.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Si acclimatano alle condizioni del laboratorio per almeno cinque giorni prima del saggio animali adulti sani e giovani. Prima del saggio gli animali vengono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi destinati ai trattamenti. In situazioni speciali possono essere usati animali molto giovani, femmine gravide o pretrattati.

Condizioni sperimentali

Animali da esperimento

Gli studi tossicocinetici possono essere effettuati su una o più specie animali appropriate, e dovrebbero tenere conto delle specie usate o che si pensa di usare per altri studi tossicologici sulla medesima sostanza in esame. Quando in un saggio si fa uso di ratti, la variazione del peso corporeo non dovrebbe essere maggiore del $\pm 20\%$ del peso medio.

Numero e sesso

Per gli studi di assorbimento e di escrezione sarebbe opportuno che in ciascun gruppo di dose vi siano inizialmente quattro animali. Una preferenza per l'uno o l'altro sesso non è imperativa, ma in determinate circostanze può essere necessario studiare entrambi i sessi. Se vi sono differenze di risposta secondo i sessi, quattro individui per sesso dovrebbero essere sottoposti al saggio. Nel caso di studi su animali diversi dai roditori può essere usato un numero minore di individui.

Quando si studia la distribuzione nei tessuti, la grandezza del gruppo iniziale dovrebbe tenere conto sia del numero degli animali da sacrificare in ciascuna fase che del numero delle fasi da considerare.

Negli studi del metabolismo le dimensioni del gruppo sono in relazione con le esigenze specifiche dello studio. Per gli studi con dosi multiple e in fasi multiple, le dimensioni del gruppo dovrebbero tenere conto del numero sia delle fasi che dei sacrifici in programma, e in ogni caso il gruppo non deve comprendere meno di due animali. Le dimensioni del gruppo dovrebbero essere sufficienti per fornire una caratterizzazione accettabile dell'assorbimento, del plateau e della deplezione (a seconda del caso considerato) della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti.

Livelli di dosaggio

Nel caso della somministrazione in un'unica dose almeno due livelli di dosaggio dovrebbero essere usati. Vi dovrebbero essere una dose bassa, alla quale non si osservano effetti tossici, e una dose elevata, alla quale vi possono essere cambiamenti dei parametri tossicocinetici o si manifestano effetti tossici.

Nel caso della somministrazione di dosi ripetute la dose bassa è normalmente sufficiente, ma in determinate circostanze può essere necessaria anche una dose alta.

Vie di somministrazione

Gli studi tossicocinetici dovrebbero essere effettuati facendo uso della stessa via e, se del caso, dello stesso veicolo usato, o che si pensa di usare negli altri studi di tossicità. La sostanza in esame è normalmente somministrata per via orale mediante sonda gastrica o nella dieta, o è applicata alla cute, o somministrata per inalazione per periodi di tempo definiti a gruppi di animali da esperimento. Per la determinazione dell'assorbimento relativo per altre vie può essere utile la somministrazione della sostanza in esame per via endovenosa. Entro breve tempo della somministrazione endovenosa di una sostanza è inoltre possibile ottenere utili informazioni sul suo profilo di distribuzione.

Si dovrebbe tener presente la possibilità di un'interferenza fra il veicolo e la sostanza in esame. Si dovrebbe fare attenzione alle differenze di assorbimento fra la somministrazione delle sostanze in esame per sonda gastrica e rispettivamente nell'alimentazione, ed all'esigenza di una determinazione precisa della dose, specialmente quando la sostanza in esame viene somministrata con la dieta.

Periodo di osservazione

Tutti gli animali dovrebbero essere osservati quotidianamente, e dovrebbe essere presa nota di tutti i segni di tossicità e degli altri elementi clinici rilevanti, ivi compresi il momento dell'insorgenza, il grado e la durata.

Procedimento

Dopo la pesatura degli animali di saggio si somministra per una via appropriata la sostanza in esame. Se lo si considera importante, gli animali possono essere tenuti a digiuno prima della somministrazione della sostanza in esame.

Assorbimento

La velocità e l'entità dell'assorbimento della sostanza somministrata possono essere valutate secondo diversi metodi, con o senza gruppi di riferimento ⁽¹⁾, ad esempio:

- attraverso la determinazione della quantità della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti negli escreti, quali l'urina, la bile, le feci e l'aria inspirata, e della quantità che rimane nella carcassa;
- attraverso il raffronto della risposta biologica (ad esempio negli studi della tossicità acuta) fra i gruppi sottoposti al saggio e i gruppi di controllo e/o di riferimento;
- attraverso il raffronto della quantità di sostanza e/o di metabolita escreta per via renale nei gruppi sottoposti al saggio e in gruppi di riferimento;
- attraverso la determinazione dell'area al di sotto della curva del livello plasmatico in funzione del tempo della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti, e attraverso il raffronto con i dati di un gruppo di riferimento.

⁽¹⁾ In questo metodo un gruppo di riferimento è un gruppo nel quale la sostanza in esame è somministrata per un'altra via che permette la disponibilità completa della dose.

Distribuzione

Sono attualmente disponibili due procedure che possono essere usate insieme o separatamente per le analisi dei profili di distribuzione:

- un'utile informazione qualitativa si ottiene facendo uso di tecniche autoradiografiche su tutto il corpo;
- un'informazione quantitativa si ottiene sacrificando gli animali a intervalli diversi dopo l'esposizione e determinando la concentrazione e la quantità della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti nei tessuti e negli organi.

Escrezione

Negli studi di escrezione si raccolgono l'urina, le feci e l'aria espirata e, in determinate circostanze, la bile. La quantità della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti dovrebbe essere misurata in detti escreti ad intervalli diversi dopo l'esposizione, fino a che sia stato escreto intorno al 95 % della dose somministrata, ovvero per sette giorni, secondo la condizione che si verifica per prima.

In casi speciali può essere necessario considerare l'escrezione della sostanza in esame nel latte degli animali da esperimento che allattano i piccoli.

Metabolismo

Per determinare l'estensione e il profilo del metabolismo si dovrebbero analizzare campioni biologici secondo tecniche appropriate. Se vi è la necessità di dare risposta a quesiti derivanti da studi tossicologici precedenti si dovrebbero chiarire le strutture dei metaboliti e proporre vie metaboliche appropriate. Per ottenere informazioni sulle vie metaboliche può essere proficuo effettuare studi in vitro.

Ulteriori informazioni sulle relazioni fra il metabolismo e la tossicità possono essere ottenute da studi biochimici, quali la determinazione degli effetti sui sistemi di enzimi metabolizzanti, sulla deplezione dei composti sulfidrilici endogeni non proteici e sull'unione della sostanza con macromolecole.

2. DATI

In relazione al tipo di studio effettuato i dati dovrebbero essere riassunti in forma di tabella integrata se del caso da rappresentazioni grafiche. Per ciascun gruppo di saggio dovrebbero essere poste in evidenza, in tutti i casi in cui ciò è possibile, le variazioni medie e statistiche delle misurazioni in relazione al tempo, al dosaggio, ai tessuti e agli organi. L'entità dell'assorbimento e la quantità e la velocità dell'escrezione dovrebbero essere determinate con metodi appropriati. Quando si effettuano studi del metabolismo, la struttura dei metaboliti identificati dovrebbe essere data e le possibili vie metaboliche presentate.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- specie, ceppo, provenienza, condizioni ambientali, dieta,
- caratterizzazione di eventuali materiali marcati,
- livelli di dosaggio e intervalli usati,
- via o vie di somministrazione ed ogni veicolo usato,
- effetti tossici ed altri effetti osservati,
- metodi per la determinazione della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti nei campioni biologici, ivi compresa l'aria espirata,
- presentazione in forma tabulare delle misurazioni per sesso, dose regime, tempo, tessuti ed organi,
- presentazione dell'entità dell'assorbimento e dell'escrezione nel tempo,

- metodi per la caratterizzazione e l'identificazione di metaboliti nei campioni biologici,
- metodi per le misurazioni biochimiche concernenti il metabolismo,
- vie proposte per il metabolismo,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione e interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

B.37 NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE DOPO ESPOSIZIONE ACUTA

1. METODO

1.1. Introduzione

Per la valutazione degli effetti tossici delle sostanze è importante tener conto della facoltà di talune classi di sostanze di indurre effetti neurotossici specifici che potrebbero non essere messi in luce da altri studi di tossicità. Alcune sostanze organofosforiche, che hanno evidenziato una neurotossicità ritardata, dovrebbero essere oggetto di una valutazione in questo senso.

Saggi preliminari in vitro consentono di identificare le sostanze suscettibili di indurre una polineuropatia ritardata; tuttavia risultati di studi in vitro non garantiscono l'assenza di neurotossicità della sostanza saggiata.

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Le sostanze organofosforiche comprendono esteri, tioesteri o anidridi organofosforici neutri degli acidi organofosforico, organofosfonico o organofosforamidico o dei corrispondenti acidi fosfortioico, fosfonotioico o fosfortioamidico, o altre sostanze suscettibili di indurre gli effetti neurotossici ritardati talvolta osservati in questa classe di sostanze.

La neurotossicità ritardata è una sindrome associata ad atassia prolungata a comparsa tardiva, ad assonopatie distali del midollo spinale e dei nervi periferici e ad un'inibizione e un invecchiamento dell'esterasi suggestiva di neuropatia (NTE, neuropathy target esterase) nei tessuti nervosi.

1.3. Sostanze di riferimento

Una sostanza di riferimento può essere saggiata in un gruppo di controllo positivo al fine di dimostrare che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, la reazione delle specie esaminate non ha subito variazioni significative.

Una sostanza neurotossica di comune utilizzo è il tri-*o*-tolil fosfato [CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, nomenclatura CAS: acido fosforico, tris (2-metilfenil)estere], noto anche come tris-*o*-cresilfosfato.

1.4. Principio del metodo di saggio

La sostanza in esame viene somministrata per via orale in un'unica dose a galline eventualmente protette contro effetti colinergici acuti. Gli animali vengono tenuti in osservazione per 21 giorni al fine di individuare eventuali anomalie del comportamento, atassia e paralisi. A 24 e 48 ore di distanza dalla somministrazione vengono effettuate analisi biochimiche, e in particolare l'inibizione della NTE, su galline selezionate da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità. Ventun giorni dopo l'esposizione si sopprimono gli animali superstiti e si procede all'esame istopatologico di determinati tessuti nervosi.

1.5. Descrizione del metodo di saggio

1.5.1. Preparazioni

Galline adulte, giovani e sane, che non presentino affezioni virali e non siano trattate con farmaci suscettibili di alterare i risultati del saggio, nonché esenti da turbe della deambulazione, vengono assegnate in modo casuale a gruppi da trattare e di controllo e acclimatate alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio.

Le gabbie o i recinti saranno sufficientemente ampi affinché gli animali possano muoversi liberamente ed essere facilmente osservati durante la deambulazione.

Di norma la sostanza in esame viene somministrata per via orale tramite sonda gastrica, capsule di gelatina o un metodo analogo. Le sostanze liquide possono essere

somministrate non diluite o disciolte in un veicolo appropriato, quale l'olio di mais. Se possibile, si avrà cura di sciogliere le sostanze solide, in quanto dosi elevate di tali sostanze in capsule di gelatina possono non essere completamente assorbite. Per i veicoli non acquosi, le caratteristiche di tossicità del veicolo dovranno essere note o, in caso contrario, determinate prima del saggio.

1.5.2. Condizioni sperimentali

1.5.2.1. Animali da esperimento

Si utilizzeranno di preferenza galline domestiche ovaiole (*Gallus gallus domesticus*), giovani e adulte, di età compresa tra 8 e 12 mesi, appartenenti a razze e a ceppi di taglia standard. Gli animali saranno allevati in condizioni che ne garantiscano la libertà di movimento.

1.5.2.2. Numero e sesso

Oltre al gruppo da trattare, si utilizzeranno un gruppo di controllo positivo ed uno con somministrazione del solo veicolo. Quest'ultimo sarà trattato in modo identico al primo, tranne per il fatto che agli animali non verrà somministrata la sostanza in esame.

Ogni gruppo dovrà comprendere un numero sufficiente di animali, in modo che almeno sei esemplari possano essere soppressi per effettuare le analisi biochimiche (tre a 24 ore e tre a 48 ore di distanza dalla somministrazione) ed altri sei possano sopravvivere per i 21 giorni del periodo di osservazione.

Il gruppo di controllo positivo può essere attuale o appartenere a studi recentemente effettuati. Esso comprenderà almeno sei animali trattati con una sostanza neurotossica nota ad effetto ritardato, tre dei quali saranno destinati alle analisi biochimiche e tre all'osservazione. È opportuno procedere ad un aggiornamento periodico dei dati storici. Nuovi dati di controllo positivo dovranno essere elaborati ogniqualvolta venga modificato un elemento essenziale del saggio (quale il ceppo, il tipo di alimentazione o le condizioni di alloggiamento degli animali).

1.5.2.3. Livelli di dosaggio

Per la determinazione del livello di dosaggio da utilizzare nello studio principale si procederà ad uno studio preliminare su un numero adeguato di animali suddivisi in gruppi trattati con diversi livelli di dosaggio. Per una corretta definizione di detto parametro sono generalmente necessari in questa fase preliminare, un certo numero di decessi. Tuttavia, al fine di evitare decessi cagionati da effetti colinergici acuti, si potrà fare ricorso ad atropina o ad un altro agente protettivo che non sia suscettibile di interferire con eventuali reazioni neurotossiche ritardate. Esistono diversi metodi per la determinazione della dose massima non letale di una sostanza (vedi metodo B.1 bis). Anche i dati di precedenti studi su galline o altre informazioni tossicologiche possono essere utili a questo scopo.

Il livello di dosaggio da utilizzare nello studio principale deve essere il più elevato possibile tenendo conto dei risultati ottenuti nello studio preliminare per la determinazione del dosaggio e del limite massimo di 2 000 mg/kg peso corporeo. Indipendentemente dal tasso di mortalità, è indispensabile che un numero sufficiente di animali sopravviva per l'esecuzione delle analisi biochimiche (sei) e dell'esame istologico del ventunesimo giorno (sei). Per evitare decessi cagionati da effetti colinergici acuti, si potranno somministrare atropina o un analogo agente protettivo che non sia suscettibile di interferire con eventuali reazioni neurotossiche ritardate.

1.5.2.4. Saggio limite

Qualora un saggio, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 2 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, non produca effetti tossici evidenti e se i dati relativi a sostanze di struttura affine non sono suggestivi di

tossicità, può non essere necessario somministrare un dosaggio superiore. Il saggio limite è giustificato, salvo nel caso in cui l'esposizione umana comporti la necessità di utilizzare un più elevato livello di dosaggio.

1.5.2.5. Periodo di osservazione

Il periodo di osservazione avrà una durata di 21 giorni.

1.5.3. Procedimento

Dopo aver trattato gli animali con un agente protettivo atto a prevenire effetti colinergici acuti potenzialmente letali, si somministra la sostanza in esame in una singola dose.

1.5.3.1. Osservazioni generali

Il periodo di osservazione inizia subito dopo l'esposizione alla sostanza. Tutte le galline saranno accuratamente esaminate diverse volte per i primi 2 giorni e almeno quotidianamente a partire dal terzo fino alla soppressione degli animali, prevista per il ventunesimo giorno. Si registreranno tutti i segni di tossicità, nonché il momento della comparsa, la natura, la gravità e la durata di qualsiasi anomalia del comportamento. Per l'atassia si utilizzerà un sistema di classificazione comprendente un minimo di quattro livelli; si registreranno altresì i casi di paralisi. Almeno due volte alla settimana le galline selezionate per l'osservazione dovranno essere tolte dalle gabbie o sottoposte ad attività motoria forzata (per esempio salire le scale) al fine di agevolare l'osservazione degli effetti tossici minimi. Gli animali moribondi o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza dovranno essere immediatamente sottoposti ad eutanasia e ad esame necroscopico.

1.5.3.2. Peso corporeo

Tutte le galline saranno pesate poco prima della somministrazione della sostanza e almeno una volta alla settimana successivamente.

1.5.3.3. Biochimica

Pochi giorni dopo l'esposizione si sopprimeranno sei galline scelte in modo casuale da ciascuno dei gruppi trattati e di controllo negativo e tre appartenenti al gruppo di controllo positivo (se realizzato). Il cervello e il midollo spinale lombare saranno quindi preparati e analizzati per identificare un'eventuale attività di inibizione della NTE. Inoltre può essere utile effettuare la stessa analisi su tessuti del nervo sciatico. Generalmente si sopprimono tre animali per il gruppo di controllo e per ciascuno dei gruppi trattati a distanza di 24 ore ed altri tre a distanza di 48 ore, mentre le tre galline del gruppo di controllo positivo vengono sopresse dopo 24 ore. Qualora l'osservazione dei segni clinici di intossicazione (spesso valutabili in funzione della comparsa di effetti colinergici) suggerisca che l'eliminazione della sostanza tossica avviene molto lentamente, può essere preferibile effettuare altri due prelievi tissutali da tre animali nel periodo compreso tra 24 e non oltre 72 ore dopo la somministrazione.

Se del caso, è possibile effettuare su tali tessuti analisi dell'acetilcolinesterasi (AChE). Tuttavia si può avere una riattivazione spontanea dell'AChE in vivo, il che potrebbe indurre a sottovalutare il potenziale di inibizione dell'AChE di una sostanza.

1.5.3.4. Necroscopia macroscopica

L'esame necroscopico di tutti gli animali (sia di quelli soppressi come da programma che di quelli sottoposti ad eutanasia) dovrà comprendere l'osservazione dell'aspetto del cervello e del midollo spinale.

1.5.3.5. Esame istopatologico

I tessuti nervosi degli animali sopravvissuti al periodo di osservazione e non utilizzati per gli studi biochimici saranno sottoposti ad esame microscopico. Essi saranno fissati in situ con tecniche di perfusione. I prelievi tissutali saranno effettuati su cervelletto

(piano longitudinale medio), midollo allungato, midollo spinale e nervi periferici. Il midollo spinale sarà prelevato dal tratto cervicale superiore, dal terzo toracico centrale e dal tratto lombo-sacrale. Si preleveranno inoltre tessuti dal segmento distale del nervo tibiale e delle sue ramificazioni verso il muscolo gastrocnemio e dal nervo sciatico. I tessuti saranno colorati con appositi coloranti specifici per la mielina e gli assoni.

2. DATI

Di norma, se i risultati ottenuti per i parametri di valutazione adottati nel presente metodo (biochimica, istopatologia e osservazione del comportamento) sono negativi, non è necessario eseguire ulteriori saggi di neurotossicità ritardata. Risultati equivoci o non conclusivi possono invece richiedere un approfondimento.

Dovranno essere forniti i dati individuali di ciascun animale. Inoltre, tutti i dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali recanti lesioni, alterazioni del comportamento o effetti biochimici, la natura e la gravità di detti effetti o lesioni e la percentuale di animali per ogni tipo di effetto o lesione e per ogni livello di gravità. I risultati del presente studio dovranno essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti comportamentali, biochimici e istopatologici e qualsiasi altro effetto osservato nei gruppi trattati e di controllo.

I risultati numerici dovranno essere elaborati sulla base di metodi statistici appropriati e generalmente riconosciuti. I metodi statistici saranno selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. RELAZIONE

Relazione sul saggio

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

Animali da esperimento:

- ceppo utilizzato;
- numero e età degli animali;
- origine, condizioni di alloggiamento, ecc.;
- peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

Condizioni sperimentali:

- modalità precise di preparazione della sostanza in esame, stabilità e omogeneità, ove del caso;
- motivazione della scelta del veicolo;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame;
- caratteristiche della qualità del cibo e dell'acqua;
- motivazione della scelta del dosaggio;
- dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica della sostanza somministrata;
- tipo di agente protettivo e caratteristiche di somministrazione, ove del caso.

Risultati:

- dati relativi al peso corporeo;
- dati relativi alla reazione tossica per ciascun gruppo, compresa la mortalità;
- natura, gravità e durata degli effetti clinici osservati (ed eventuale reversibilità);
- descrizione particolareggiata delle analisi biochimiche e relativi risultati;
- risultati dell'esame necroscopico;
- descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici;
- elaborazione statistica dei risultati, ove del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. RIFERIMENTI

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 418.

B.38 NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE STUDIO CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA PER 28 GIORNI

1. METODO

1.1. Introduzione

Per la valutazione degli effetti tossici delle sostanze è importante tener conto della facoltà di talune classi di sostanze di indurre effetti neurotossici specifici che potrebbero non essere messi in luce da altri studi di tossicità. Alcune sostanze organofosforiche, che hanno evidenziato una neurotossicità ritardata, dovrebbero essere oggetto di una valutazione in questo senso.

Saggi preliminari in vitro consentono di identificare le sostanze suscettibili di indurre una polineuropatia ritardata; tuttavia risultati negativi di studi in vitro non garantiscono l'assenza di neurotossicità della sostanza saggiata.

Il presente saggio di neurotossicità ritardata su 28 giorni fornisce informazioni sui rischi che l'esposizione ripetuta per un periodo limitato di tempo può comportare per la salute. Esso consente di trarre indicazioni sulla correlazione dose-risposta e di valutare il NOAEL applicabile per la determinazione di criteri di sicurezza per l'esposizione.

Vedi anche introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Le sostanze organofosforiche comprendono esteri, tioesteri o anidridi organofosforici neutri degli acidi organofosforico, organofosfonico o organofosforamidico o dei corrispondenti acidi fosfortioico, fosfonotioico o fosfortioamidico, o altre sostanze suscettibili di indurre gli effetti neurotossici ritardati talvolta osservati in questa classe di sostanze.

La neurotossicità ritardata è una sindrome associata ad atassia prolungata a comparsa tardiva, ad assonopatie distali del midollo spinale e dei nervi periferici e ad un'inibizione e un invecchiamento dell'esterasi suggestiva di neuropatia (NTE, neuropathy target esterase) nei tessuti nervosi.

1.3. Principio del metodo di saggio

La sostanza in esame viene quotidianamente somministrata per via orale a galline domestiche per un periodo di 28 giorni. Gli animali vengono esaminati almeno una volta al giorno al fine di individuare eventuali anomalie del comportamento, atassia e paralisi fino a 14 giorni dopo l'ultima somministrazione. Analisi biochimiche, e in particolare l'inibizione della NTE, vengono di norma eseguite 24 e 48 ore dopo l'ultima esposizione su galline selezionate da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità. Due settimane dopo l'ultima somministrazione si sopprimono gli animali superstiti e si procede all'esame istopatologico di determinati tessuti nervosi.

1.4. Descrizione del metodo di saggio

1.4.1. Preparazioni

Galline adulte, giovani e sane, che non presentino affezioni virali e non siano trattate con farmaci suscettibili di alterare i risultati del saggio, nonché esenti da turbe della deambulazione, vengono assegnate in modo casuale a gruppi da trattare e di controllo e acclimatate alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio.

La gabbie o i recinti saranno sufficientemente ampi affinché gli animali possano muoversi liberamente ed essere facilmente osservati durante la deambulazione.

La sostanza viene somministrata giornalmente, sette giorni su sette, preferibilmente tramite sonda gastrica o capsule di gelatina. Le sostanze liquide possono essere somministrate non diluite o disciolte in un veicolo appropriato, quale l'olio di mais. Se possibile, si avrà cura di sciogliere le sostanze solide, in quanto dosi elevate di tali sostanze in capsule di gelatina possono non essere completamente assorbite. Per i veicoli non acquosi, le caratteristiche di tossicità del veicolo dovranno essere note o, in caso contrario, determinate prima del saggio.

1.4.2. Condizioni sperimentali

1.4.2.1. Animali da esperimento

Si utilizzeranno di preferenza galline domestiche ovaiole (*Gallus gallus domesticus*), giovani e adulte, di età compresa tra 8 e 12 mesi, appartenenti a razze e a ceppi di taglia standard. Gli

animali saranno allevati in condizioni che ne garantiscano la libertà di movimento.

1.4.2.2. Numero e sesso

Si utilizzano di norma almeno tre gruppi da trattare ed uno di controllo con somministrazione del solo veicolo. Quest'ultimo sarà trattato in modo identico ai primi, tranne per il fatto che agli animali non verrà somministrata la sostanza in esame.

Ogni gruppo dovrà comprendere un numero sufficiente di animali, in modo che almeno sei esemplari possano essere soppressi per effettuare le analisi biochimiche (tre a 24 e tre a 48 ore di distanza dall'ultima somministrazione) ed altri sei possano sopravvivere per i 14 giorni del periodo di osservazione.

1.4.2.3. Livelli di dosaggio

I livelli di dosaggio dovranno essere selezionati tenendo conto dei risultati del saggio di neurotossicità ritardata dopo esposizione acuta e di tutti i dati di tossicità o di tossicocinetica esistenti per la sostanza in esame. Il livello massimo di dosaggio dovrà essere tale da indurre effetti tossici, preferibilmente effetti neurotossici ritardati, senza tuttavia cagionare la morte o sofferenze gravi. Sarà inoltre definita una serie decrescente di dosaggi al fine di individuare eventuali risposte a dosi determinate e dimostrare l'assenza di effetti avversi al dosaggio minimo.

1.4.2.4. Saggio limite

Qualora un saggio, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 1000 mg/kg di peso corporeo/giorno, non produca effetti tossici evidenti e se i dati relativi a sostanze di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario somministrare un dosaggio superiore. Il saggio limite giustificato, salvo nel caso in cui l'esposizione umana comporti la necessità di utilizzare un più elevato livello di dosaggio.

1.4.2.5. Periodo di osservazione

Tutti gli animali saranno esaminati almeno quotidianamente durante il periodo di esposizione e nei 14 giorni successivi, salvo nel caso in cui sia previsto un esame necroscopico.

1.4.3. Procedimento

La sostanza in esame viene somministrata sette giorni su sette per un periodo di 28 giorni.

1.4.3.1. Osservazioni generali

Il periodo di osservazione inizia subito dopo l'esposizione alla sostanza. Tutte le galline saranno accuratamente esaminate almeno una volta al giorno per i 28 giorni del trattamento e i 14 giorni successivi, fino al momento della loro soppressione. Si registreranno tutti i segni di tossicità, specificandone il momento della comparsa, la natura, la gravità e la durata. Le osservazioni riguarderanno, tra l'altro, eventuali anomalie comportamentali. Per l'atassia si utilizzerà un sistema di classificazione comprendente un minimo di quattro livelli; si registreranno altresì i casi di paralisi. Almeno due volte alla settimana le galline selezionate per l'osservazione dovranno essere tolte dalle gabbie e sottoposte ad attività motoria forzata (per esempio salire le scale) al fine di agevolare l'osservazione degli effetti tossici minimi. Gli animali moribondi o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza dovranno essere immediatamente sottoposti ad eutanasia e ad esame necroscopico.

1.4.3.2. Peso corporeo

Tutte le galline saranno pesate poco prima della somministrazione della sostanza e almeno una volta alla settimana successivamente.

1.4.3.3. Biochimica

Pochi giorni dopo l'ultima esposizione si sopprimeranno sei galline scelte in modo casuale da ciascuno dei gruppi trattati e dal gruppo di controllo con somministrazione del solo veicolo. Il cervello e il midollo spinale lombare saranno quindi preparati e analizzati per identificare un'eventuale attività di inibizione della NTE. Inoltre può essere utile effettuare la stessa analisi su tessuti del nervo sciatico. Generalmente si sopprimono tre animali per il gruppo di controllo e per ciascuno dei gruppi trattati dopo 24 ore ed altri tre dopo 48 ore dall'ultima somministrazione. Qualora ciò risulti preferibile in base ai risultati dello studio con esposizione acuta o di altri studi (per esempio di tossicocinetica), si potranno modificare i tempi previsti per la soppressione degli

animali. Tale scelta dovrà essere tuttavia scientificamente motivata.

Se del caso, è possibile effettuare su tali tessuti analisi dell'acetilcolinesterasi (AChE). Tuttavia si può avere una riattivazione spontanea dell'AChE in vivo, il che potrebbe indurre a sottovalutare il potenziale di inibizione dell'AChE di una sostanza.

1.4.3.4. Necropsia macroscopica

L'esame necroscopico di tutti gli animali (sia di quelli soppressi come da programma che di quelli sottoposti ad eutanasia) dovrà comprendere l'osservazione dell'aspetto del cervello e del midollo spinale.

1.4.3.5. Esame istopatologico

I tessuti nervosi degli animali sopravvissuti al periodo di osservazione e non utilizzati per gli studi biochimici saranno sottoposti ad esame microscopico. Essi saranno fissati in situ con tecniche di perfusione. I prelievi tissutali saranno effettuati su cervelletto (piano longitudinale medio), midollo allungato, midollo spinale e nervi periferici. Il midollo spinale sarà prelevato dal tratto cervicale superiore, dal terzo toracico centrale e dal tratto lombosacrale. Si preleveranno inoltre tessuti dal segmento distale del nervo tibiale e delle sue ramificazioni verso il muscolo gastrocnemio e dal nervo sciatico. I tessuti saranno colorati con apposti coloranti specifici per la mielina e gli assoni. L'esame microscopico sarà dapprima effettuato su tessuti conservati di tutti gli animali del gruppo di controllo e di quello trattato con il livello massimo di dosaggio.

Qualora in questo gruppo si riscontrino effetti, si procederà all'esame microscopico di tessuti prelevati da animali appartenenti agli altri due gruppi (rispettivamente con somministrazione del dosaggio intermedio e del dosaggio minimo).

2. DATI

Di norma, se i risultati ottenuti per i parametri di valutazione adottati nel presente metodo (biochimica, istopatologia e osservazione del comportamento) sono negativi, non è necessario eseguire ulteriori saggi di neurotossicità ritardata. Risultati equivoci o non conclusivi possono invece richiedere un approfondimento.

Dovranno essere forniti i dati individuali di ciascun animale. Inoltre, tutti i dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali recanti lesioni, alterazioni del comportamento o effetti biochimici, la natura e la gravità di detti effetti o lesioni e la percentuale di animali per ogni tipo di effetto o lesione e per ogni livello di gravità.

I risultati del presente studio dovranno essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti comportamentali, biochimici e istopatologici e qualsiasi altro effetto osservato nei gruppi trattati e di controllo.

I risultati numerici dovranno essere elaborati sulla base di metodi statistici appropriati e generalmente riconosciuti. I metodi statistici saranno selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. RELAZIONE

Relazione sul saggio

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

Animali da esperimento:

- ceppo utilizzato;
- numero e età degli animali;
- origine, condizioni di alloggiamento, ecc.;
- peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

Condizioni sperimentali:

- modalità precise di preparazione della sostanza in esame, stabilità e omogeneità, ove del caso;
- motivazione della scelta del veicolo;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame;
- caratteristiche della qualità del cibo e dell'acqua;
- motivazione della scelta del dosaggio;

- dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica della sostanza somministrata;
- qualora le analisi biochimiche vengano effettuate in tempi diversi da quelli previsti (24 e 48 h), motivazione di tale scelta.

Risultati:

- dati relativi al peso corporeo;
- dati relativi alla reazione tossica per ciascun livello di dosaggio, compresa la mortalità;
- livello di esposizione massimo per il quale non siano stati osservati effetti avversi (NOAEL);
- natura, gravità e durata degli effetti clinici osservati (ed eventuale reversibilità);
- descrizione particolareggiata delle analisi biochimiche e relativi risultati;
- risultati dell'esame necroscopico;
- descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici;
- elaborazione statistica dei risultati, ove del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. RIFERIMENTI

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 419

B.39. TEST IN VIVO DI SINTESI NON PROGRAMMATA DI DNA (UDS) SU CELLULE EPATICHE DI MAMMIFERO

1. METODO

Il metodo è ripreso dal metodo OECD TG 486, (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo (1997).

1.1 INTRODUZIONE

Il saggio in vivo della sintesi non programmata di DNA (Unscheduled DNA Synthesis - UDS) su cellule epatiche di mammifero è destinato ad identificare le sostanze che inducono la riparazione del DNA nelle cellule epatiche degli animali trattati (vedi 1,2,3,4).

Questo test in vivo fornisce un metodo per studiare gli effetti genotossici di sostanze chimiche sul fegato. L'effetto misurato è indice di danno al DNA e successiva riparazione nelle cellule epatiche. Il fegato è di norma la sede principale del metabolismo delle sostanze assorbite. Rappresenta pertanto il sito idoneo per misurare in vivo il danno al DNA.

Questo saggio non è idoneo se è evidente che la sostanza in esame non raggiunge il tessuto bersaglio.

La sintesi non programmata di DNA (UDS) è misurata determinando l'assorbimento di nucleosidi marcati nelle cellule in cui non è in corso una sintesi programmata (fase S) del DNA. La tecnica più comunemente usata è la determinazione mediante autoradiografia dell'assorbimento di timidina marcata con tritio (³H-TdR). Per il test UDS in vivo si usa di preferenza il fegato di ratto. Si possono usare anche altri tessuti, ma non sono oggetto del presente metodo.

L'individuazione di una risposta UDS dipende dal numero di basi del DNA escisse e sostituite nel sito danneggiato. Il saggio di UDS pertanto è particolarmente valido per individuare la riparazione di sequenze lunghe (da 20 a 30 basi) indotta dalla sostanza. È molto meno sensibile invece trattandosi di rilevare la riparazione di sequenze corte (1-3 basi). Fenomeni di mutagenesi possono inoltre risultare da mancata riparazione o riparazione difettosa di lesioni del DNA o da errata replicazione. Il grado di risposta di UDS non fornisce alcuna indicazione sulla fedeltà del meccanismo di riparazione. Inoltre un agente mutageno può reagire con il DNA senza che il danno prodotto al DNA sia riparato con un processo di riparazione per escissione. L'impossibilità di ottenere con il saggio UDS informazioni specifiche sull'attività mutagenica è compensata dalla sua potenziale sensibilità, in quanto viene misurato nell'intero genoma.

Vedi anche Introduzione generale parte B.

1.2 DEFINIZIONI

Cellule in riparazione: cellule in cui il numero di grani nucleari netti (NNG) è superiore ad un valore prestabilito, che il laboratorio che effettua il saggio deve motivare.

Grani nucleari netti (NNG): misura quantitativa in autoradiografia dell'attività di UDS delle cellule, calcolata sottraendo il numero medio di grani citoplasmici in aree citoplasmiche equivalenti al nucleo (CG) dal numero di grani nucleari (NG): $NNG = NG - CG$. I NNG sono conteggiati per le singole cellule, poi sommati per le cellule di una coltura, di colture in parallelo, ecc..

Sintesi non programmata di DNA (UDS): Sintesi di riparazione del DNA dopo escissione e rimozione di un tratto di DNA che contiene una regione danneggiata per effetto di sostanze chimiche o agenti fisici.

1.3 PRINCIPIO METODOLOGICO

Il saggio UDS in vivo su cellule epatiche di mammifero permette di individuare la sintesi di riparazione del DNA dopo escissione e rimozione di un tratto di DNA contenente una regione che presenta un danno indotto da sostanze chimiche o agenti fisici. Il test è di solito basato sull'incorporazione di ³H-TdR nel DNA di cellule epatiche che presentano una bassa frequenza di cellule nella fase S del ciclo cellulare. La captazione di ³H-TdR è solitamente determinata mediante autoradiografia, non essendo tale tecnica soggetta ad interferenze da parte delle cellule nella fase S, a differenza, per esempio, del conteggio per scintillazione a liquido.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Preparazioni**

1.4.1.1 *Scelta delle specie animali*

Il ratto è la specie più comunemente usata, ma si può usare qualsiasi specie di mammifero adatta. Si scelgano individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. All'inizio dello studio la variazione di peso tra gli animali deve essere minima e non superare $\pm 20\%$ del peso medio per sesso.

1.4.1.2 *Condizioni di stabulazione e alimentazione*

Valgono le condizioni generali citate nell'Introduzione generale alla parte B; l'umidità ideale è pari al 50-60%.

1.4.1.3 *Preparazione degli animali*

Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere disposte in modo da minimizzare eventuali effetti dovuti alla posizione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni.

1.4.1.4 *Sostanze in esame/Preparazione*

Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in adeguati solventi o mezzi disperdenti e, se necessario, diluite prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima del trattamento. Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è ammissibile.

1.4.2 **Condizioni di esperimento**

1.4.2.1 *Solvente/mezzo disperdente*

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.

1.4.2.2 Controlli

Ogni parte dell'esperimento condotta separatamente dovrà comprendere controlli positivi e negativi (solvente/mezzo disperdente). Gli animali dei vari gruppi dovranno essere trattati in modo identico, salvo per la somministrazione della sostanza in esame.

I controlli positivi devono essere effettuati con sostanze che producono UDS in vivo a livelli di esposizione ai quali è previsto un aumento rilevabile rispetto alla media. I controlli positivi che richiedono un'attivazione metabolica devono essere usati a dosi che provochino una risposta moderata (4) Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati. Fra gli esempi di sostanze per i controlli positivi si citano:

Fasi di campionamento	Sostanza	No. CAS	No. EINECS
Fasi di campionamento precoci (2-4 ore)	N-Nitrosodimetilammina	62-75-9	200-249-8
Fasi di campionamento tardive (12-16 ore)	N-2-Fluorenilacetammide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Sono ammesse altre sostanze adeguate per i controlli positivi. Il controllo positivo può essere somministrato per una via diversa rispetto alla sostanza in esame.

1.5 PROCEDURA

1.5.1 Numero e sesso degli animali

Si usi un numero di animali adeguato, per tener conto delle normali variazioni biologiche di risposta al saggio. Ogni gruppo dovrebbe comprendere almeno 3 animali analizzabili. Qualora esista una base di dati precedenti significativa, sono sufficienti 1 o 2 animali per i gruppi di controllo negativo e positivo.

Se al momento dello studio sono disponibili dati relativi a studi sulla stessa specie, nei quali è stata usata la stessa via di esposizione, che dimostrano che non vi sono sostanziali differenze di tossicità tra i sessi, sarà sufficiente effettuare il test su un singolo sesso, preferibilmente sui maschi. Se l'esposizione umana a sostanze chimiche è specifica per un sesso, per esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, il test deve essere eseguito su animali di tale sesso.

1.5.2 Protocollo di trattamento

Le sostanze in esame vengono in generale somministrate in un'unica presa.

1.5.3 Dosi

Di norma si usano almeno due dosi. La dose massima è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali. In linea di principio la dose inferiore dovrebbe andare dal 50% al 25% della dose massima.

Sostanze con azione biologica specifica, non tossiche a dosi basse (come ormoni e mitogeni) possono costituire eccezione rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. Se si procede a uno studio del range, non essendo disponibili dati utili in materia, questo va eseguito nello stesso laboratorio, sulla stessa specie e ceppo, con il medesimo protocollo usato nel test principale.

La dose massima può anche essere definita come dose che produce qualche segno di epatotossicità (p.es. nuclei picnotici).

1.5.4 **Saggio con dose limite**

Se la somministrazione una dose di almeno 2000 mg/kg di peso corporeo in una singola presa o in due prese lo stesso giorno non produce effetti tossici rilevabili, e se non c'è ragione di sospettare genotossicità sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente correlate, può essere superfluo uno studio completo. Se si prevede la possibilità che esseri umani siano esposti alla sostanza in esame, può essere necessario usare una dose più elevata nel test con dose limite.

1.5.5 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione, oppure mediante iniezione intraperitoneale. Possono essere accettate altre vie se esiste una valida ragione. La via intraperitoneale non è però raccomandata, in quanto potrebbe esporre il fegato alla sostanza in esame direttamente, e non attraverso il sistema circolatorio. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio; non deve superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi più elevati deve essere motivato. Salvo per sostanze irritanti o corrosive, che di norma riveleranno effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, le variazioni di volume devono essere minimizzate, regolando la concentrazione in modo da garantire un volume costante a tutte le dosi.

1.5.6 **Preparazione delle cellule epatiche**

Di norma le cellule epatiche sono prelevate da animali trattati e preparate 12-16 ore dopo la somministrazione. In genere è necessario un altro prelievo dopo un periodo più breve (di norma da 2 a 4 ore dopo il trattamento), salvo che a 12-16 ore si abbia una risposta positiva chiara. Si possono comunque usare fasi di campionamento diverse se motivate sulla base di dati tossicocinetici.

Le colture a breve termine di cellule epatiche di mammifero sono di solito costituite mediante perfusione del fegato in situ con collagenasi, lasciando poi le cellule epatiche appena dissociate aderire ad una superficie idonea. Le cellule epatiche dei controlli negativi dovrebbero avere una vitalità (5) almeno del 50 %.

1.5.7 **Determinazione della UDS**

Le cellule epatiche di mammifero appena isolate sono poste in incubazione, di norma su terreno contenente ^3H -TdR, per un periodo adeguato, per esempio da 3 a 8 ore. Al termine dell'incubazione, si rimuove il terreno dalle cellule, che possono poi essere incubate con terreno contenente un eccesso di timidina non marcata, per ridurre la radioattività non incorporata ("cold chase"). Le cellule vengono poi risciacquate, fissate ed essiccate. Per tempi di incubazione più prolungati, la "cold chase" può essere superflua. I vetrini sono immersi in emulsione autoradiografica, esposti al buio (p.es. refrigerati per 7-14 giorni), sviluppati, colorati; si contano quindi i grani d'argento. Per ogni animale si preparano due o tre vetrini.

1.5.8 **Analisi**

I preparati su vetrino devono contenere cellule di morfologia normale in numero sufficiente per permettere una valutazione probante dell'UDS. I preparati sono esaminati al microscopio alla ricerca di segni evidenti di citotossicità (p.es. picnosi, livelli ridotti di radiomarcatura).

Si codifichino i vetrini prima del conteggio dei grani. Di norma si analizzano 100 cellule per animale, su almeno due vetrini. L'analisi di un numero inferiore a 100 cellule per animale deve essere motivato. Nel conteggio dei grani non si tiene conto dei nuclei in fase S, ma si può registrare la percentuale delle cellule in fase S.

Il grado di incorporazione della $^3\text{H-TdR}$ nel nucleo e nel citoplasma di cellule morfologicamente normali, messo in evidenza dal deposito di granuli di argento, deve essere determinato mediante metodi adeguati.

Il numero dei grani è determinato sui nuclei (grani nucleari, NG) e su aree del citoplasma equivalenti al nucleo (grani citoplasmici, CG). Il numero dei CG è determinato prendendo in considerazione l'area più densamente marcata del citoplasma, oppure in base alla media di due o più regioni citoplasmiche adiacenti al nucleo, scelte casualmente. Si possono usare altri metodi di conteggio (p.es. il conteggio delle cellule complete) se motivabili (6).

2. **RISULTATI**

2.1 **TRATTAMENTO DEI RISULTATI**

Si forniscano i dati relativi ai singoli vetrini e ai singoli animali. Inoltre tutti i dati devono essere riassunti in tabelle. Il numero dei grani nucleari netti (NNG) va determinato per ciascuna cellula, per ciascun animale e per ciascuna dose e fase di prelievo sottraendo il numero dei CG dal numero dei NG. Se si contano le "cellule in riparazione", i criteri di definizione delle "cellule in riparazione" devono essere motivati e basati sui dati di controlli negativi precedenti o paralleli. I risultati numerici possono essere valutati mediante metodi statistici. Gli eventuali test statistici devono essere scelti e motivati prima di condurre lo studio.

2.2 **VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Esempi di criteri che permettono di concludere che la risposta è positiva o negativa:

risposta positiva	(i)	valori di NNG superiori ad un soglia prestabilito, motivato sulla base di dati di laboratorio precedenti;
o	(ii)	valori di NNG significativamente maggiori rispetto al controllo parallelo.
risposta negativa	(i)	valori di NNG uguali o inferiori al soglia dei controlli precedenti;
o	(ii)	valori di NNG non significativamente maggiori rispetto al controllo parallelo.

Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico; si tenga conto di parametri quali le variazioni intraspecifiche, la relazione dose-risposta e la citotossicità. Si possono usare metodi statistici come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali, ma la significatività statistica non dovrebbe essere l'unico attore determinante di una risposta positiva.

La maggior parte degli esperimenti fornirà indubbiamente risultati chiaramente positivi o negativi ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.

Risultati positivi del saggio in vivo su cellule epatiche di mammifero indicano che la sostanza in esame induce nel DNA di cellule epatiche di mammifero in vivo un danno che può essere riparato in vitro mediante sintesi non programmata del DNA. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni di esperimento, la sostanza in esame non induce nel DNA danni rilevabili mediante questo saggio.

Si vagli la probabilità che la sostanza in esame o i suoi metaboliti entrino in circolo o raggiungano specificamente il tessuto bersaglio (tossicità sistemica).

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio dovrà contenere le seguenti informazioni:

Solvente/mezzo disperdente

- motivazione della scelta del mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se nota;

Animali da laboratorio:

- specie/ceppo usato;
- numero, età e sesso degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;
- peso dei singoli animali all'inizio del test, con range, media e deviazione standard per ciascun gruppo;

Condizioni di esperimento:

- controlli positivi e negativi mezzo disperdente/solvente;
- range, se effettuato;
- criteri di selezione delle dosi;
- illustrazione particolareggiata della preparazione della sostanza in esame;
- illustrazione particolareggiata della somministrazione della sostanza in esame;
- criteri di selezione della via di somministrazione;
- metodi usati per verificare che la sostanza in esame sia entrata in circolo o abbia raggiunto il tessuto bersaglio, se del caso;
- conversione della concentrazione (ppm) della sostanza in esame nel cibo o nell'acqua potabile nella dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno), se del caso;
- dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua;
- descrizione dettagliata dei protocolli di trattamento e campionamento;

- metodi di misura della tossicità;
- metodo di preparazione e di coltura delle cellule epatiche;
- tecnica autoradiografica usata;
- numero di vetrini preparati e numero di cellule analizzate;
- criteri di valutazione;
- criteri in base ai quali i risultati sono giudicati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

- valori medi dei grani nucleari, dei grani citoplasmici, e dei grani nucleari netti per vetrino, per animale e per gruppo;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- eventuali analisi statistiche;
- segni di tossicità;
- dati sui controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) e positivi paralleli;
- dati sui precedenti controlli negativi (solvente/mezzo disperdente) con ranges, medie e deviazioni standard;
- numero di "cellule in riparazione", se determinato;
- numero di cellule in fase S, se determinato;
- vitalità delle cellule.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, 1-18.
2. Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. *Mutation Res.* 189, 123-133.
3. Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pagg. 52-77.
4. Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo. *Mutation Res.*, 312, 263-285.
5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS). *Mutation Res.*, 291, 21-27.
6. Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen.* 4, 553-562.

B.40. CORROSIONE CUTANEA

1. METODO

1.1 INTRODUZIONE

Il Centro europeo per la convalida dei metodi alternativi (CECMA) del Centro comune di ricerca della Commissione europea ha confermato la validità scientifica di due test *in vitro* per determinare la corrosività cutanea di determinate sostanze. Trattasi del saggio di resistenza elettrica transcutanea della pelle di ratto (TER, *transcutaneous electrical resistance*) e di un test che utilizza un modello di cute umana (1)(2)(3). Lo studio di convalida del CECMA ha dimostrato che entrambi i metodi consentono di distinguere adeguatamente le sostanze che notoriamente sono corrosive per la pelle da quelle non corrosive. Inoltre, il protocollo del test che utilizza un modello di cute umana consente di distinguere i diversi gradi degli effetti corrosivi (agenti noti per essere estremamente corrosivi, R35 e altri agenti corrosivi, R34) (2). Di entrambi i test sono fornite la descrizione e le procedure. La scelta del test da utilizzare è dettata dai requisiti specifici e dalle preferenze dell'utilizzatore.

Cfr. anche la parte B nell'introduzione generale.

1.2 DEFINIZIONI

Corrosione cutanea: produzione di danni irreversibili al tessuto cutaneo a seguito dell'applicazione di un materiale da saggiare.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna specifica, ma cfr. i punti 1.5.3.4 e 1.7.2.3.

1.4 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO - SAGGIO DI RESISTENZA ELETTRICA TRANSCUTANEA DELLA PELLE DI RATTO

Il materiale di saggio è applicato per un massimo di 24 ore alle superfici epidermiche di lembi di cute di forma circolare (dischi) ottenuti dal mantello di giovani ratti sacrificati in maniera non cruenta. I materiali corrosivi sono identificati in base alla loro capacità di intaccare la normale integrità dello strato corneo e della sua funzione protettiva in termini di riduzione della normale resistenza elettrica transcutanea (TER) al di sotto di un determinato livello soglia (5k Ω) (4)(5). I materiali irritanti e non irritanti non riducono la TER al di sotto del livello soglia. Il test può comprendere anche una valutazione della capacità di legame con colorante per saggiare i surfactanti e le sostanze organiche neutre (per una definizione cfr. la voce bibliografica (6)) allo scopo di ridurre il numero dei risultati di falso positivo ottenuti specificatamente con questi tipi di sostanze chimiche (2) (7).

1.5 DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO - SAGGIO DI RESISTENZA ELETTRICA TRANSCUTANEA DELLA PELLE DI RATTO

1.5.1 **Animali**

Per la preparazione dei dischi cutanei vengono utilizzati giovani ratti (ratti Wistar o un ceppo equivalente di 20-23 giorni). Con un'apposita tosatrice viene rimosso il pelo della parte dorsale e laterale dell'animale. L'animale viene quindi accuratamente strofinato e lavato lungo il dorso e i fianchi tenendo la parte tosata immersa in una soluzione antibiotica (contenente per es. streptomina, penicillina, cloramfenicolo e anfotericina in concentrazioni tali da inibire la proliferazione dei batteri). Dopo 3-4 giorni si procede ad un ulteriore lavaggio con antibiotici. Gli animali così trattati devono essere utilizzati entro tre giorni al massimo (per la produzione dei preparati cutanei gli animali non devono aver superato il 31° giorno di vita).

1.5.2 **Preparazione dei lembi cutanei**

Gli animali vengono sacrificati con un metodo non cruento. Si procede quindi alla rimozione della parte dorsale della cute e all'accurata eliminazione di tutto il grasso in eccesso. Il lembo cutaneo così ottenuto viene posizionato sull'estremità di una provetta in PTFE (politetrafluoroetilene) in modo che la superficie epidermica sia a contatto con la provetta, viene quindi fissato all'estremità della provetta mediante una ghiera inserita a pressione ed infine vengono eliminati gli orli di pelle debordante. La Figura 1 indica le dimensioni della provetta e della ghiera. Infine la ghiera viene accuratamente saldata all'estremità della provetta mediante gelatina di petrolio. La provetta viene fissata mediante una pinza a molla e quindi introdotta in un recipiente contenente una soluzione di magnesio solfato (154mM) (Figura 2).

1.5.3 Procedura

1.5.3.1 Applicazione del materiale di saggio

Le sostanze da saggiare in forma liquida (150 μ l) vengono applicate alla superficie epidermica all'interno della provetta (Figura 2). Per il saggio di materiali solidi la sostanza è applicata in quantità sufficiente al disco cutaneo in modo da coprire l'intera superficie dell'epidermide. Si aggiunge acqua deionizzata (150 μ l) sulla parte superiore del materiale solido ed infine si agita lievemente la provetta. Le sostanze da saggiare dovrebbero entrare in contatto con la cute il più possibile. A tale scopo, nel caso di alcuni materiali solidi occorre procedere a fusione della sostanza da saggiare innalzando la temperatura ad un massimo di 30°C, oppure macinando la sostanza fino a produrne un granulato o una polvere.

Per ciascuna sostanza da saggiare vengono utilizzati tre dischi cutanei. L'applicazione dura 24 ore (cfr. anche 1.5.3.4). La sostanza viene quindi completamente rimossa mediante lavaggio sotto un getto di acqua corrente ad una temperatura di 30°C al massimo. Per facilitare l'eliminazione delle sostanze da saggiare che si sono solidificate all'interno della provetta si procede a lavaggio sotto acqua corrente a 30°C circa.

1.5.3.2 Misurazione della TER

La TER viene misurata utilizzando un ponte dati a corrente alternata a basso voltaggio (ad es. AIM 401 oppure 6401 o equivalente). Prima di misurare la resistenza elettrica viene ridotta la tensione di superficie della cute aggiungendo etanolo al 70% in quantità tale da coprire l'intera epidermide. Dopo alcuni secondi si procede alla rimozione dell'etanolo mediante inversione della provetta e in seguito all'idratazione del tessuto per mezzo di una soluzione di 3ml di magnesio solfato (154mM). Per misurare la resistenza in k Ω /disco si piazzano gli elettrodi del ponte dati su entrambi i lati del disco (Figura 2). La Figura 1 mostra le dimensioni degli elettrodi e la lunghezza della parte dell'elettrodo che rimane al di sotto delle pinze a coccodrillo. Nel corso della misurazione la molletta di fissaggio dell'elettrodo interno (il più spesso) viene collocata sull'estremità superiore della provetta affinché una buona parte dell'elettrodo rimanga immersa nella soluzione di magnesio solfato. L'elettrodo esterno (più sottile) è collocato all'interno del recipiente in modo tale che rimanga sul fondo. La distanza tra il lato inferiore della molletta di fissaggio e il fondo della provetta deve essere mantenuta costante (Figura 1) poiché influisce sui valori della resistenza elettrica.

Va osservato che qualora il valore di resistenza superi i 20k Ω , ciò potrebbe dipendere dal fatto che la sostanza ha formato un manto di rivestimento sulla superficie epidermica del disco cutaneo. Il rivestimento può essere rimosso ad esempio sigillando la provetta col pollice rivestito da un guanto e scuotendola per circa 10 secondi. Si procede dunque all'eliminazione della soluzione di magnesio solfato e si ripete la misurazione della resistenza con una nuova soluzione.

La media dei risultati dei valori riferiti alla TER viene accettata a condizione che i valori concomitanti positivi e negativi rientrino nel margine (range) accettabile per il metodo. Le sostanze di controllo da saggiare e i relativi valori minimi e massimi di resistenza accettabili per il metodo e le apparecchiature descritte sono i seguenti:

Controllo	Sostanza	Range delle resistenze (k Ω)
Positivo	10M Acido cloridrico (36%)	0.5 - 1.0
Negativo	Acqua distillata	10 - 25

1.5.3.3 Procedura specifica per surfactanti e sostanze organiche neutre

Se i valori della TER di sostanze di saggio che rientrano nelle categorie dei surfactanti o delle sostanze organiche neutre sono inferiori o pari a 5k Ω , si può procedere ad una valutazione della penetrazione del colorante nel tessuto. Tale procedura consente di stabilire se si tratta di risultati falso positivi (2).

1.5.3.3.1 *Applicazione e rimozione del colorante solforodamina B*

Dopo il trattamento iniziale con la sostanza di saggio viene applicata alla superficie dell'epidermide di ciascun disco cutaneo una soluzione di 150µl al 10% (p/v) di solforodamina B diluita in acqua distillata per un periodo di 2 ore. I dischi cutanei vengono quindi lavati sotto un getto di acqua corrente a temperatura ambiente per circa 10 secondi al fine di eliminare completamente il colorante. Ogni disco cutaneo viene quindi rimosso cautamente dalla provetta e collocato in una fiala (ad es. una fiala di scintillazione in vetro da 20ml) contenente acqua deionizzata (8ml). Le fiale vengono poi agitate leggermente per 5 minuti per eliminare completamente il colorante. Questa procedura di risciacquo viene ripetuta per procedere quindi alla rimozione dei dischi cutanei che vengono successivamente collocati in fiale contenenti 5ml di una sostanza al 30% (p/v) di sodio dodecil solfato (SDS) diluita in acqua distillata. Le fiale vengono quindi incubate per tutta la notte ad una temperatura di 60°C. Dopo il periodo di incubazione ogni singolo disco cutaneo viene rimosso ed eliminato e la soluzione rimanente viene quindi centrifugata per 8 minuti ad una temperatura di 21°C (forza centrifuga relativa ~175). Si preleva quindi un campione di 1ml del supernatante che viene diluito in parte 1 a 5 (p/v) [ovvero 1ml + 4ml] in una soluzione di SDS al 30% (p/v) in acqua distillata. La densità ottica (DO) della soluzione viene misurata a circa 565nm.

1.5.3.3.2 *Calcolo del tenore del colorante*

Per ogni disco cutaneo si calcola il tenore del colorante solforodamina B in base ai valori della DO (coefficiente di estinzione molare della solforodamina B a 565nm = $8,7 \times 10^4$; peso molecolare = 580). Per ciascun disco cutaneo si stabilisce il tenore del colorante e si calcola la media del tenore per i replicati. I valori medi della colorazione sono accettati a condizione che i valori di controllo concomitanti rientrino nel range accettabile per il metodo. Il range del tenore del colorante ritenuto accettabile per le sostanze di controllo in base alla metodologia e alle apparecchiature descritte sono:

Controllo	Sostanza	Range del colorante (µg/disco)
Positivo	10M Acido cloridrico (36%)	40 - 100
Negativo	Acqua distillata	15 - 35

1.5.3.4 *Ulteriori dati*

Le sostanze da saggiare possono essere applicate ai dischi cutanei anche per periodi più brevi (ad es. 2 ore) per identificare i materiali che sono estremamente corrosivi. Tuttavia nello studio di convalida è emerso che il saggio TER stimava in eccesso il potenziale corrosivo di una serie di sostanze chimiche da saggiare applicate ai dischi cutanei per 2 ore (2), sebbene consentisse di identificare correttamente le sostanze corrosive e quelle non corrosive dopo un'applicazione di 24 ore.

Le proprietà e le dimensioni delle apparecchiature e della procedura sperimentale utilizzata possono influire sui valori TER. La soglia di corrosività di 5kΩ è stata stabilita sulla base di dati ottenuti con le apparecchiature specifiche e le procedure descritte nel presente metodo. Se le condizioni di saggio vengono modificate in maniera significativa è probabile che si debbano applicare soglie e valori di controllo diversi. Di conseguenza si raccomanda di calibrare la metodologia e i valori soglia di resistenza testando una serie di sostanze standard di riferimento scelte tra quelle utilizzate nel primo studio di convalida (3).

1.6 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO - SAGGIO DEL MODELLO DI CUTE UMANA

Il materiale da saggiare viene applicato localmente ad un modello tridimensionale di cute umana per un massimo di 4 ore; tale modello comprende uno strato epidermico ricostruito in cui è presente anche uno strato corneo funzionale. I materiali corrosivi vengono identificati in base alla loro capacità di ridurre la vitalità delle cellule (ad es. come nel caso del saggio di riduzione MTT) al di sotto di determinati livelli soglia per periodi di esposizione specifici. Il principio del saggio è basato sull'ipotesi che le sostanze chimiche corrosive sono in grado di penetrare lo strato corneo (per diffusione o erosione) e che la loro citotossicità è tale da provocare la necrosi degli strati cellulari sottostanti.

1.7 DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO - SAGGIO DEL MODELLO DI CUTE UMANA

1.7.1 Modelli di cute umana

I modelli di cute umana possono provenire da varie fonti, ma devono comunque soddisfare determinati criteri. Il modello di cute deve avere uno strato corneo funzionale e uno strato sottostante di cellule viventi. Lo strato corneo deve essere in grado di svolgere la sua funzione di barriera in modo adeguato. La sua funzionalità può essere appurata dimostrando la capacità di resistenza del modello di cute alla citotossicità mediante applicazione di sostanze notoriamente citotossiche per le cellule ma normalmente non in grado di attraversare la barriera dello strato corneo. Il modello deve poter fornire risultati riproducibili in condizioni sperimentali ben definite.

La vitalità delle cellule viventi nel modello cutaneo deve essere tale da consentire un'adeguata discriminazione tra le sostanze di controllo positive e negative. La vitalità cellulare (ad es. misurata mediante la quantità di riduzione MTT, ovvero un valore della DO) dopo esposizione ad una sostanza di controllo negativa deve rientrare in limiti accettabili per il modello specificatamente utilizzato. Analogamente i valori della vitalità cellulare in riferimento alla sostanza di controllo positiva (correlati a quelli della sostanza di controllo negativa) devono rientrare in limiti specifici. È essenziale che il modello predittivo utilizzato rispetti gli standard di convalida internazionali.

1.7.2 Procedura

1.7.2.1 Applicazione del materiale di saggio

Nei saggi di materiali liquidi occorre applicare la sostanza da saggiare in quantità tale da coprire la superficie cutanea (almeno 25µl/cm²). Nei saggi di materiali solidi si applica la sostanza da saggiare in quantità sufficiente da coprire la cute, quindi la si inumidisce per garantire un contatto ottimale con la cute. Eventualmente le sostanze solide devono essere polverizzate prima dell'applicazione. Il metodo di applicazione deve risultare adeguato per un'ampia gamma di tipi di sostanze chimiche (cfr. riferimento bibliografico 2). Al termine del periodo di esposizione il materiale da saggiare deve essere accuratamente rimosso dalla superficie cutanea mediante una soluzione salina.

1.7.2.2 Misurazione della vitalità cellulare

Per misurare la vitalità cellulare è possibile utilizzare qualsiasi metodo quantitativo convalidato. Il saggio generalmente più utilizzato è la riduzione MTT che in numerosi laboratori ha fornito risultati accurati e riproducibili (2). Il disco di cute viene collocato in una soluzione MTT di 0,3mg/ml ad una temperatura di 20-28°C per 3 ore. Viene quindi estratto il prodotto precipitato blu formazan (estrazione per solvente) e misurata la concentrazione del formazan determinando la DO ad una lunghezza d'onda compresa fra 545 e 595 nm.

1.7.2.3 Ulteriori dati

Il modello cutaneo utilizzato e il protocollo preciso dei tempi di esposizione e delle procedure di lavaggio, ecc. incidono notevolmente sui dati della vitalità cellulare. Si raccomanda pertanto di calibrare la metodologia e il modello predittivo mediante analisi di una serie di standard scelti tra una gamma di sostanze chimiche utilizzate nello studio di convalida del CECMA (3). Il metodo utilizzato deve risultare riproducibile sia all'interno di un laboratorio che tra laboratori per numerose sostanze chimiche in base a standard internazionali. Come minimo il metodo dovrebbe soddisfare il criterio della validità scientifica definito in precedenza (2) e i risultati dello studio di convalida devono essere stati pubblicati in una rivista scientifica dotata di comitato di revisione.

2. DATI

2.1 ELABORAZIONE DEI RISULTATI

2.1.1 Saggio TER della pelle di ratto

I valori della resistenza ($k\Omega$) del materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e tutte le sostanze chimiche standard di riferimento dovrebbero essere riportati in una tabella contenente i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione, i valori medi e le classificazioni ottenute.

2.1.2 Saggio del modello di cute umana

I valori della DO e i dati sulla vitalità cellulare calcolati in percentuale e relativi al materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e tutte le sostanze chimiche standard di riferimento dovrebbero essere riportati in una tabella contenente i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione, i valori medi e le classificazioni ottenute.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

2.2.1 Saggio TER della pelle di ratto

Se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza di saggio supera i $5k\Omega$, la sostanza non è corrosiva. Se tale valore è inferiore o pari a $5k\Omega$ e la sostanza da saggiare non è un surfactante o un organico neutro allora è corrosiva.

Per i surfactanti o le sostanze organiche neutre i cui valori TER sono inferiori o pari a $5k\Omega$ è possibile procedere ad una valutazione della penetrazione del colorante. Se il tenore medio del colorante sul disco cutaneo è superiore o pari al valore medio del tenore del colorante riferito alla sostanza di controllo positiva al 36% di HCl ottenuto in concomitanza, allora la sostanza di saggio è un vero positivo ed è dunque corrosiva. Se il tenore medio è inferiore al tenore medio della sostanza di controllo positiva al 36% di HCl ottenuta in concomitanza, allora la sostanza di saggio è un falso positivo e non è corrosiva.

2.2.2 Saggio del modello di cute umana

Il valore della DO del controllo negativo rappresenta il 100% della vitalità cellulare, di conseguenza i valori DO ottenuti per ciascun campione da saggiare possono essere utilizzati per calcolare una percentuale di vitalità del controllo negativo. La percentuale critica della vitalità cellulare che differenzia i materiali di saggio corrosivi da quelli non corrosivi (o che distingue tra diverse classi di corrosività) deve essere chiaramente definita nel modello predittivo prima della convalida del metodo e il successivo studio di convalida deve dimostrare che tale valore critico è adeguato (cfr. riferimento bibliografico 2).

3. RELAZIONE

RELAZIONE SUL TEST

La relazione concernente l'intero saggio deve contenere almeno le seguenti informazioni:

Sostanza di saggio:

- dati inerenti l'identificazione, la natura fisica ed eventualmente le proprietà fisico-chimiche. Questi dati dovrebbero essere forniti anche per le sostanze di riferimento, se utilizzate.

Condizioni di saggio:

- descrizione dettagliata della procedura utilizzata;
- descrizione e motivazione di eventuali modifiche.

Risultati:

- presentazione in forma tabulare dei valori della resistenza (saggio TER) o dei valori della vitalità cellulare (saggio del modello di cute umana) espressi in percentuale per il materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e qualsiasi altra sostanza chimica standard di riferimento, inclusi i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione e le medie;
- descrizione di qualunque altro effetto osservato.

Discussione dei risultati

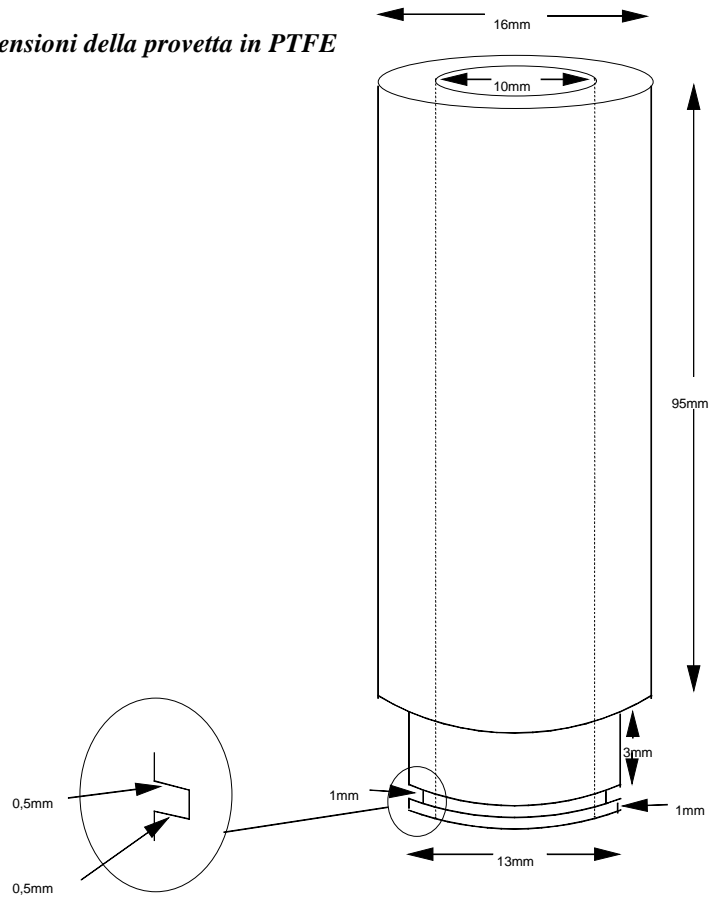
Conclusioni

4. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

1. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* **26**, 275-280.
2. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzthutter, H-G. & Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* **12**, 483-524.
3. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro* **12**, 471-482.
4. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test - modifications and validation. *Food & Chemical Toxicology* **24**, 507-512.
5. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. *Toxicology in Vitro* **6**, 191-194.
6. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998). An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA* **26**, 709-720.
7. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* **23**, 219-255.

Figura 1

Dimensioni della provetta in PTFE



Dimensioni degli elettrodi

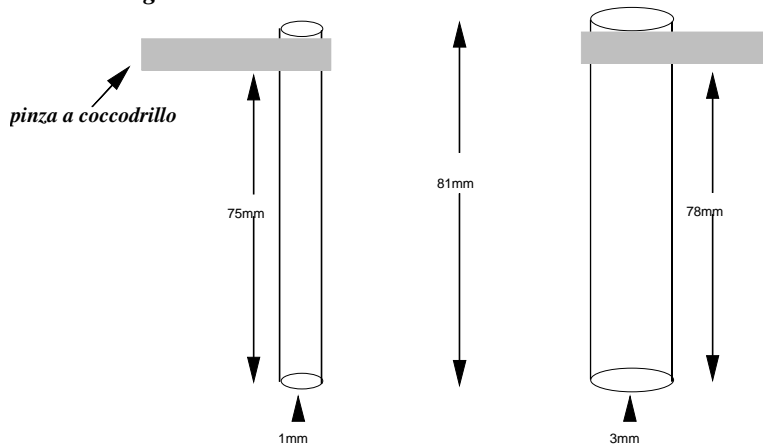
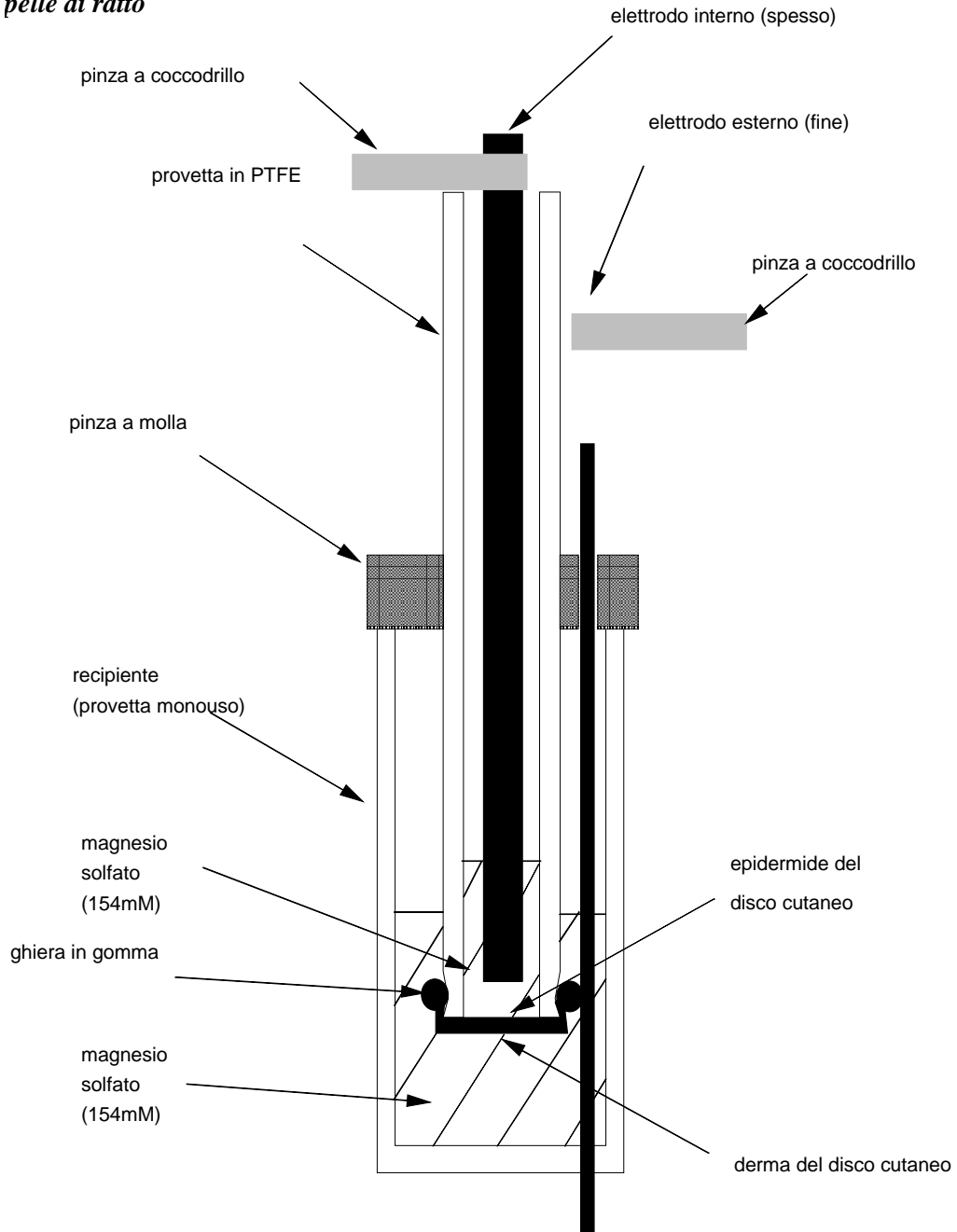


Figura 2

Apparecchiatura per il saggio della TER della pelle di ratto



B. 41. FOTOTOSSICITÀ - TEST DI FOTOTOSSICITÀ IN VITRO 3T3 NRU

1. METODO

1.1 INTRODUZIONE

Per fototossicità si intende la risposta tossica che si manifesta dopo esposizione primaria della cute ad alcune sostanze chimiche e successiva esposizione alla luce, o che è indotta analogamente da irradiazione della cute dopo somministrazione sistemica di una sostanza chimica.

I dati ottenuti mediante il test di fototossicità in vitro 3T3 NRU consentono di identificare il potenziale fototossico di una sostanza di prova, e cioè la presenza o l'assenza di eventuali rischi connessi alla sostanza di prova in associazione ad esposizione ai raggi UV e alla luce visibile.

Poiché l'*endpoint* tossicologico del test in vitro è la determinazione della *fotocitotossicità* indotta dall'azione combinata di una sostanza chimica e della luce, il test permette di identificare i composti che sono fototossici in vivo dopo applicazione sistemica e distribuzione sulla cute e i composti con effetto fotoirritante dopo applicazione topica alla cute.

Il test di fototossicità in vitro 3T3 NRU è stato sviluppato e validato nell'ambito di un progetto congiunto UE/COLIPA durante il periodo 1992-1997 (1)(2)(3) allo scopo di definire una valida alternativa in vitro ai vari test in vivo normalmente utilizzati. Nel 1996 un workshop dell'OCSE ha raccomandato l'uso di test sequenziali in vitro per la valutazione della fototossicità (4).

I risultati del test di fototossicità in vitro 3T3 NRU sono stati confrontati con gli effetti di fototossicità acuta/fotoirritazione in vivo in animali e soggetti umani, dimostrando così l'eccellente predittività del test per tali effetti. Il test non è progettato per prevedere altri effetti indesiderati che potrebbero derivare dall'azione combinata di una sostanza chimica e della luce, come ad esempio la *fotogenotossicità*, la *fotoallergia* e la *fotocarcinogenicità*, sebbene molte sostanze chimiche che presentano queste specifiche proprietà reagiscano positivamente al test di fototossicità in vitro 3T3 NRU. Inoltre, il test non è progettato per consentire una valutazione del *potere fototossico*.

Nell'allegato 1 è descritto un sistema sequenziale per l'esecuzione di prove di fototossicità su sostanze chimiche.

1.2 DEFINIZIONI

Irradiazione: l'intensità della luce ultravioletta (UV) o visibile incidente su una superficie, misurata in W/m² o mW/cm².

Dose di luce: la quantità (= intensità × tempo) di radiazione ultravioletta (UV) o visibile incidente su una superficie, espressa in joule (= W × s) per area di superficie, ovvero J/m² o J/cm².

Bande di frequenza d'onda della luce UV: i valori raccomandati dalla CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) sono: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). Sono in uso, inoltre, altri valori: spesso la distinzione fra UVB e UVA viene posta a 320 nm e gli UVA possono essere suddivisi in UV-A1 e UV-A2, con una distinzione posta a circa 340 nm.

Vitalità cellulare: parametro che misura l'attività totale di una popolazione di cellule (ad esempio la captazione del colorante vitale rosso neutro nei lisosomi cellulari) che, in funzione dell'*endpoint* misurato e del tipo di test impiegato, è correlato al numero totale e/o alla vitalità delle cellule.

Vitalità cellulare relativa: vitalità cellulare espressa in relazione a controlli negativi (solventi) che sono stati sottoposti al test completo (+UV o -UV) senza trattamento con una sostanza chimica di prova.

Modello di predittività: algoritmo impiegato per trasformare i risultati di un test di tossicità in dati predittivi del potenziale tossico. In base alle linee guida per l'esecuzione del test è possibile utilizzare il PIF e l'MPE per la trasformazione dei risultati del test di fototossicità in vitro 3T3 NRU in dati predittivi del potenziale fototossico.

PIF (Photo Irritation Factor): fattore ottenuto paragonando due concentrazioni di pari citotossicità (EC_{50}) della sostanza chimica di prova in assenza (-UV) e in presenza (+UV) di una irradiazione non citotossica con luce UVA/visibile.

MPE (Mean Photo Effect): recente misura derivata dall'analisi matematica della forma completa di due curve di concentrazione-risposta ottenuta in assenza (-UV) e in presenza (+UV) di una irradiazione non citotossica con luce UVA/visibile.

Fototossicità: risposta tossica acuta che si manifesta dopo esposizione primaria della cute ad alcune sostanze chimiche e successiva esposizione alla luce, o che è indotta analogamente da irradiazione della cute dopo somministrazione sistemica di una sostanza chimica.

Fotoirritazione: sottospecie del termine 'fototossicità' impiegato per descrivere solo le reazioni fototossiche prodotte sulla cute dopo esposizione a sostanze chimiche (somministrate per via topica o orale). Tali reazioni fototossiche causano sempre danni cellulari non specifici (reazioni analoghe all'eritema solare).

Fotoallergia: reattività immunologica acquisita che non si verifica al primo trattamento con una sostanza chimica e successiva esposizione alla luce ma che necessita di un periodo di induzione di una o due settimane prima che sia possibile dimostrare la reattività cutanea.

Fotogenotossicità: risposta genotossica osservata con un *endpoint* genetico, che si manifesta dopo esposizione delle cellule a una dose di luce UV/visibile e a una sostanza chimica non genotossica.

Fotocarcinogenicità: carcinogenicità indotta dalla ripetuta applicazione di luce e di una sostanza chimica. Si utilizza il termine 'foto-co-carcinogenesi' quando la cancerogenesi indotta dagli UV viene aumentata da una sostanza chimica.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Oltre alla sostanza chimica di controllo positivo *clorpromazina*, che andrebbe testata simultaneamente in tutti i saggi, per effettuare il test di fototossicità 3T3 NRU si raccomanda di impiegare come sostanze chimiche di riferimento un sottogruppo delle sostanze utilizzate nelle analisi interlaboratorio per il presente test (1)(3)(13).

1.4 CONSIDERAZIONI INIZIALI

È noto che molti tipi di sostanze chimiche inducono effetti fototossici (5)(6)(7)(8). L'unica caratteristica che hanno in comune è la capacità di assorbire l'energia luminosa nello spettro della luce solare. In base alla prima legge della fotochimica (legge di Grotthaus-Draper) la fotoreazione richiede un assorbimento sufficiente di quanti di luce. Pertanto, prima di effettuare la prova biologica in base alle linee guida qui descritte, è necessario determinare uno spettro di assorbimento della luce UV/visibile per la sostanza chimica di prova (ad esempio, in base alle linee guida dell'OCSE: OECD Test Guideline 101). Se il coefficiente di estinzione/assorbimento molare è inferiore a $10 \text{ litri} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, la sostanza chimica non ha alcun potenziale fotoreattivo e non occorre sottoporla al test di fototossicità in vitro 3T3 NRU, né ad altre prove biologiche atte a determinare effetti fotochimici indesiderati (allegato 1).

1.5 PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Sono stati identificati quattro meccanismi in base ai quali l'assorbimento della luce da parte di un cromoforo (chimico) può provocare una risposta fototossica (7). Tutti e quattro i meccanismi provocano lesioni cellulari. Pertanto, il test di fototossicità in vitro 3T3 NRU è basato sul confronto della citotossicità di una sostanza chimica testata con e senza esposizione a una dose non citotossica di luce UVA/visibile. In questo test, la citotossicità viene espressa come riduzione, dipendente dalla concentrazione, della captazione del colorante vitale rosso neutro (NR, (9)) 24 ore dopo il trattamento con la sostanza chimica di prova e l'irradiazione.

Dapprima si preparano cellule Balb/c 3T3 che vengono mantenute in coltura per 24 h per permettere la formazione di monostrati. Quindi, per ogni sostanza chimica di prova vengono preincubate due piastre a 96 pozzetti con otto diverse concentrazioni della sostanza chimica per 1 h. Una delle due piastre viene poi esposta a una dose non citotossica di luce UVA/visibile di 5 J/cm² UVA (esperimento +UV), mentre l'altra piastra viene mantenuta nell'oscurità (esperimento -UV). In entrambe le piastre, il terreno di trattamento viene poi sostituito con il terreno di coltura e, dopo altre 24 h di incubazione, si determina la vitalità cellulare tramite captazione del rosso neutro (Neutral Red Uptake, NRU) per 3 h. Per ognuna delle otto concentrazioni di prova viene dunque calcolata la vitalità cellulare relativa, espressa come percentuale dei controlli negativi non trattati. Per prevedere il potenziale fototossico vengono confrontate le risposte di concentrazione ottenute in presenza (+UV) e in assenza (-UV) di irradiazione, generalmente al livello EC₅₀, cioè alla concentrazione che inibisce la vitalità cellulare del 50% rispetto ai controlli non trattati.

1.6 CRITERI DI QUALITÀ

Sensibilità delle cellule agli UVA; dati storici: Ad intervalli regolari occorre controllare la sensibilità delle cellule agli UVA. Le cellule vengono seminate alla stessa densità utilizzata nel test di fototossicità in vitro 3T3 NRU; il giorno successivo vengono irradiate con dosi di UVA da 1 a 9 J/cm², e il giorno ancora successivo si determina la vitalità cellulare tramite saggio di NRU. Le cellule soddisfano i requisiti di qualità se la loro vitalità, dopo irradiazione con 5 J/cm² di UVA, non è inferiore all'80% della vitalità dei controlli mantenuti nell'oscurità. Alla dose massima di UVA (9 J/cm²), la vitalità non deve essere inferiore al 50% rispetto a quella dei controlli mantenuti nell'oscurità. Questo controllo va ripetuto all'incirca ogni dieci passaggi di cellule.

Sensibilità agli UVA delle cellule di controllo negativo; test in oggetto: Il test soddisfa i criteri di qualità se i controlli negativi (cellule in soluzione salina isotonica di Earl (EBSS) con o senza l'1% di dimetilsolfossido (DMSO) o l'1% di etanolo (EtOH)) nell'esperimento +UVA mostrano una vitalità non inferiore all'80% di quella delle cellule non irradiate nello stesso solvente del corrispondente esperimento in oscurità (-UVA).

Vitalità dei controlli negativi: La densità ottica assoluta (OD_{540 NRU}) misurata nell'estratto di rosso neutro dei controlli negativi indica se le cellule (1×10⁴) seminate in ogni pozzetto siano cresciute con un tempo di raddoppiamento normale durante i due giorni della prova. Il test soddisfa i criteri di accettazione se la OD_{540 NRU} media dei controlli non trattati è ≥ 0,2.

Controllo positivo: Contemporaneamente al test di fototossicità in vitro 3T3 NRU si testa una sostanza chimica notoriamente fototossica. Si raccomanda l'uso di clorpromazina (CPZ) poiché tale sostanza è stata impiegata come controllo positivo nello studio di validazione UE/COLIPA. Per la CPZ testata con il protocollo standard nel test di fototossicità in vitro 3T3 NRU sono stati definiti i seguenti criteri di accettazione: *CPZ irradiata (+UVA):* EC₅₀ = da 0,1 a 2,0 µg/ml; *CPZ non irradiata (-UVA):* EC₅₀ = da 7,0 a 90,0 µg/ml. Il PIF, cioè lo spostamento di EC₅₀, deve essere almeno pari a 6.

Come controlli positivi concomitanti, al posto della CPZ possono essere impiegate altre sostanze chimiche notoriamente fototossiche, corrispondenti alla classe chimica o alle caratteristiche di solubilità della sostanza chimica di prova. In questo caso, sulla base dei dati storici, occorre definire adeguatamente il range di EC₅₀ e del PIF o MPE come criterio di accettazione del test.

1.7 DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.7.1 Preparazioni

1.7.1.1 Cellule

Nello studio di validazione è stata usata una linea cellulare permanente di fibroblasti di topo - Balb/c 3T3, clone 31 - proveniente dall'ATCC o dall'ECACC. Se ne raccomanda pertanto l'uso in ogni test. Applicando lo stesso protocollo si possono utilizzare con eguale efficacia anche altre cellule o linee cellulari se le condizioni della coltura vengono adattate alle esigenze specifiche delle cellule; tuttavia, è necessario dimostrare l'equivalenza.

È necessario verificare con regolarità che le cellule non siano contaminate da micoplasmi; le cellule vanno utilizzate solo se i risultati dei controlli sono soddisfacenti.

Poiché la sensibilità delle cellule agli UVA può aumentare con il numero di passaggi, vanno impiegate cellule Balb/c 3T3 del numero più basso ottenibile di passaggi, preferibilmente inferiore a 100. È importante che la sensibilità delle cellule Balb/c 3T3 agli UVA venga controllata regolarmente seguendo la procedura di controllo della qualità descritta in queste linee guida.

1.7.1.2 *Condizioni dei mezzi e della coltura*

Per il passaggio di routine delle cellule e durante il test è necessario utilizzare mezzi di coltura e condizioni di incubazione adeguati. Nel caso delle cellule Balb/c 3T3, occorre integrarle con DMEM al 10% di siero di vitello neonato, 4 mM di glutamina, penicillina e streptomina, nonché incubazione umidificata a 37 °C / 7,5% di CO₂. È particolarmente importante che le condizioni della coltura cellulare assicurino un tempo di ciclo cellulare compreso nel normale range storico delle cellule o della linea cellulare utilizzate.

1.7.1.3 *Preparazione delle colture*

Le cellule ottenute da colture base congelate vengono seminate nel terreno di coltura alla densità adeguata e poste in sottocoltura almeno una volta prima di essere utilizzate per il test di fototossicità in vitro 3T3 NRU.

Per il test di fototossicità occorre seminare le cellule nel terreno di coltura ad una densità tale che impedisca alle colture di raggiungere la confluenza prima della fine, cioè quando viene determinata la vitalità cellulare 48 h dopo la semina. Per le cellule Balb/c 3T3 coltivate in piastre a 96 pozzetti la densità raccomandata è di 1×10^4 cellule per pozzetto.

Per ogni sostanza chimica di prova si seminano cellule in maniera identica in due diverse piastre a 96 pozzetti, che vengono poi sottoposte simultaneamente all'intera procedura in condizioni colturali identiche, salvo il periodo di tempo in cui una delle piastre viene irradiata (+UVA/visibile) mentre l'altra viene tenuta nell'oscurità (-UVA/visibile).

1.7.1.4 *Attivazione metabolica*

Mentre l'uso di sistemi metabolizzanti è un requisito generale di tutte le prove in vitro per la previsione della genotossicità e del potenziale carcinogenico, finora, nel caso della fototossicologia, non si conosce alcuna sostanza chimica che necessita della trasformazione metabolica per agire da fototossina in vivo o in vitro. Pertanto non si ritiene necessario, né scientificamente giustificato, svolgere questo test con un sistema di attivazione metabolica.

1.7.1.5 *Sostanza chimica di prova / Preparazione*

Le sostanze chimiche di prova devono essere preparate di fresco immediatamente prima dell'uso, a meno che la conservazione risulti accettabile in base ai dati relativi alla stabilità. Quando è probabile che si verifichi una rapida fotodegradazione può essere necessaria la preparazione a luce rossa.

Le sostanze chimiche di prova vanno dissolte in soluzioni saline tampone, come la soluzione isotonica di Earl (EBSS) o la soluzione salina tampone fosfato (PBS) che, per evitare interferenze durante l'irradiazione, devono essere prive di componenti proteiche e colori indicatori di pH che assorbono la luce.

Le sostanze chimiche di prova limitatamente solubili in acqua devono essere dissolte in solventi adeguati, ad una concentrazione pari a 100 volte la concentrazione finale desiderata e poi diluite in 1:100 con la soluzione tampone. Eventuali solventi devono essere presenti a un volume costante dell'1% (v/v) in tutte le colture, e cioè sia nei controlli negativi che in tutte le concentrazioni della sostanza chimica di prova.

I solventi raccomandati sono il dimetilsolfossido (DMSO) e l'etanolo (EtOH). Possono essere adatti anche altri solventi a bassa citotossicità (come l'acetone), ma è necessario valutarne attentamente le proprietà specifiche, quali la reazione con la sostanza chimica di prova, l'estinzione dell'effetto fototossico, le proprietà di cattura dei radicali.

Se necessario si può procedere a miscelazione tramite vortex e/o sonicazione e/o riscaldamento fino a 37 °C per favorire la solubilizzazione.

1.7.1.6 Irradiazione UV / Preparazione

Fonte di luce: la scelta di una fonte di luce e di un filtro adeguati è il fattore più importante ai fini di un corretto test della fototossicità. Gli spettri di UVA e della luce visibile si associano generalmente a fotosensibilizzazione (7)(10), mentre gli UVB sono meno rilevanti perché fortemente citotossici in via diretta, visto che la loro citotossicità aumenta di 1000 volte da 313 a 280 nm (11). Per scegliere una fonte luminosa adeguata valgono, tra l'altro, i seguenti criteri essenziali: la fonte di luce deve emettere lunghezze d'onda assorbite dalla sostanza chimica di prova e la dose di luce (ottenibile in tempi ragionevoli) deve essere sufficiente per individuare i fotosensibilizzanti noti. Inoltre, le lunghezze d'onda e le dosi utilizzate non devono essere eccessivamente nocive per il sistema, che comporta anche emissione di calore (regione dell'infrarosso).

La fonte di luce ottimale è la simulazione della luce del sole con simulatori solari. Nei simulatori solari si usano sia gli archi allo xeno che gli archi di mercurio e ad alogenuri metallici (drogati). Questi ultimi presentano il vantaggio di emettere meno calore e di essere meno costosi, ma la loro corrispondenza con la luce solare non è perfetta. Poiché tutti i simulatori solari emettono quantità significative di UVB, vanno muniti di filtri adeguati per attenuare le lunghezze d'onda UVB altamente citotossiche.

Per il test di fototossicità in vitro 3T3 NRU è necessario usare uno spettro di irradiazione praticamente privo di UVB (UVA:UVB ~ 1:20). È stato pubblicato un esempio della distribuzione dell'irradiazione spettrale del simulatore solare con filtro impiegato nello studio di validazione del test di fototossicità in vitro 3T3 NRU (3).

Dosimetria: Prima di effettuare il test di fototossicità occorre controllare regolarmente l'intensità della luce (irradiazione) mediante opportuno misuratore UV a banda larga. Il misuratore UV deve essere stato calibrato sulla fonte. È necessario controllare la funzionalità del misuratore UV e, a tale scopo, si raccomanda di impiegare un secondo misuratore UV di riferimento, dello stesso tipo e con identica calibrazione. L'ideale sarebbe che, a intervalli di tempo più lunghi, con uno spettroradiometro si misurasse l'irradiazione spettrale della fonte di luce filtrata e si controllasse la calibrazione del misuratore UV a banda larga; tali strumenti richiedono tuttavia l'intervento di personale specializzato.

Lo studio di validazione ha stabilito che una dose di 5 J/cm² (UVA) non è citotossica per le cellule Balb/c 3T3 ed è sufficientemente potente per eccitare anche le sostanze chimiche a bassa fototossicità. Allo scopo di ottenere una dose di 5 J/cm² entro 50 minuti, l'irradiazione deve essere regolata a 1,666 mW/cm². Se si utilizzano un'altra linea cellulare o una diversa fonte di luce, potrebbe essere necessario adattare leggermente la dose di UVA, a condizione che non sia nociva per le cellule e che sia sufficiente per individuare le fototossine standard. Il tempo di esposizione alla luce si calcola come segue:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose di irradiazione (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiazione (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2 Condizioni di esecuzione del test

La concentrazione massima della sostanza chimica di prova non deve superare i 100 µg/ml, poiché la fototossicità di tutte le sostanze chimiche è stata rilevata a concentrazioni inferiori, mentre a concentrazioni maggiori aumenta l'incidenza dei falsi positivi (previsioni sovrastimate) (13). Il pH della concentrazione più alta della sostanza chimica di prova deve essere soddisfacente (range del pH: 6,5 - 7,8).

I range delle concentrazioni di una sostanza chimica sottoposta a prova in presenza (+UVA) e in assenza (-UVA) di luce vanno determinati in modo adeguato in precedenti esperimenti espressamente effettuati a tale scopo. Occorre adeguare il range e l'intervallo di una serie di concentrazioni in modo che le curve concentrazione-risposta siano sufficientemente corroborate da dati sperimentali. È necessario utilizzare le serie di concentrazioni geometriche (con un fattore di diluizione costante).

1.7.3 **Procedura del test¹**

1.7.3.1 *Primo giorno*

Preparare una sospensione di cellule di 1×10^5 cellule/ml nel terreno di coltura e versare 100 μ L di terreno di coltura solo nei pozzetti periferici di una piastra per microtitolazione di coltura tissutale a 96 pozzetti (= bianchi). Nei restanti pozzetti versare 100 μ L di una sospensione cellulare di 1×10^5 cellule/ml (= 1×10^4 cellule/pozzetto). Per ciascuna sostanza chimica di prova preparare due piastre: una per determinare la citotossicità (-UVA) e l'altra per determinare la fotocitotossicità (+UVA).

Incubare le cellule per 24 h (7,5% di CO₂, 37 °C) finché formano un monostrato semiconfluente. Questo periodo di incubazione tiene conto del recupero e dell'aderenza delle cellule, nonché della crescita esponenziale.

1.7.3.2 *Secondo giorno*

Dopo l'incubazione, far decantare il terreno di coltura dalle cellule e lavare due volte con 150 μ L di EBSS/PBS per pozzetto. Aggiungere 100 μ L di EBSS/PBS contenente la concentrazione corretta della sostanza chimica di prova o solo solvente (controllo negativo). Utilizzare 8 diverse concentrazioni della sostanza chimica di prova. Incubare le cellule con la sostanza chimica di prova nell'oscurità per 60 minuti (7,5% di CO₂, 37 °C).

Per eseguire la parte +UVA del test, irradiare le cellule a temperatura ambiente per 50 minuti attraverso il coperchio della piastra con 1,7 mW/cm² di UVA (= 5 J/cm²). Ventilare con una ventola per evitare la condensazione di H₂O sotto il coperchio. Mantenere le altre piastre (-UVA) a temperatura ambiente in una scatola scura per 50 minuti (= tempo di esposizione agli UVA).

Far decantare la soluzione di prova e lavare due volte con 150 μ L di EBSS/PBS. Sostituire l'EBSS/PBS con terreno di coltura e incubare (7,5% di CO₂, 37 °C) per una notte (18-22 h).

1.7.3.3 *Terzo giorno*

Esame al microscopio

Esaminare le cellule con un microscopio a contrasto di fase. Registrare i cambiamenti morfologici delle cellule dovuti agli effetti citotossici della sostanza chimica di prova. Si raccomanda questo controllo per escludere errori sperimentali, sebbene questi dati non vengano utilizzati per la valutazione della citotossicità o della fototossicità.

Prova della captazione del rosso neutro

Lavare le cellule con 150 μ L di EBSS/PBS preriscaldato. Rimuovere la soluzione lavante con lievi colpetti. Aggiungere 100 μ L di terreno al rosso neutro e incubare a 37 °C in atmosfera umidificata al 7,5% di CO₂ per 3 ore.

Dopo l'incubazione, rimuovere il terreno al rosso neutro e lavare le cellule con 150 μ L di EBSS/PBS. Far decantare e asciugare totalmente l'EBSS/PBS. (Centrifugare a piastra rovesciata è opzionale).

Aggiungere esattamente 150 μ L di soluzione di estinzione di rosso neutro (etanolo/acido acetico preparati di fresco).

Scuotere rapidamente la piastra di microtitolazione con un agitatore per 10 minuti fino ad estrazione del rosso neutro dalle cellule e formazione di una soluzione omogenea.

Misurare la densità ottica dell'estratto di rosso neutro a 540 nm con uno spettrofotometro, utilizzando i bianchi come riferimento. Salvare i dati nel formato di file adeguato (ad esempio ASCII) per le analisi successive.

¹ Per ulteriori dettagli, cfr. il riferimento bibliografico (12).

2 DATI

2.1 QUALITÀ E QUANTITÀ DEI DATI

I dati devono permettere un'analisi significativa della concentrazione-risposta ottenuta in presenza e in assenza di irradiazione UVA/visibile. Se si rileva citotossicità, è necessario fissare sia il range della concentrazione che l'intervallo delle singole concentrazioni in modo da adattare una curva ai dati sperimentali. Poiché una sostanza chimica di prova potrebbe non essere citotossica fino alla concentrazione limite definita di 100 µg/ml nell'esperimento in oscurità (-UVA), ma altamente citotossica in caso di irradiazione (+UVA), potrebbe essere necessario che i range della concentrazione da testare differiscano per ordine di grandezza per garantire un'adeguata qualità dei dati. Se non si rileva citotossicità in nessuna delle due parti dell'esperimento (-UVA e +UVA), è sufficiente effettuare il test con un maggiore intervallo fra dosi singole fino alla concentrazione più elevata.

Non occorre verificare i risultati chiaramente positivi ripetendo l'esperimento. Non occorre neppure verificare i risultati chiaramente negativi, purché la sostanza chimica di prova sia stata testata a concentrazioni sufficientemente alte. In tali casi è sufficiente un esperimento principale, sostenuto da uno o più esperimenti preliminari di definizione dei range.

I test che hanno dato risultati *borderline* vicini alla linea di demarcazione del modello di predittività vanno ripetuti per verifica.

Se si ritiene necessario ripetere il test, potrebbe essere importante variare le condizioni sperimentali allo scopo di ottenere un risultato chiaro. Una variabile fondamentale di questo test è la preparazione delle soluzioni della sostanza chimica di prova. Pertanto, la variazione di tali condizioni (co-solvente, triturazione, sonicazione) può essere di enorme importanza nel test di ripetizione. Alternativamente si può prendere in considerazione l'ipotesi di variare il tempo di incubazione pre-irradiazione. Un tempo più breve può essere determinante per le sostanze chimiche instabili in acqua.

2.2 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Ove possibile, si determina la concentrazione di una sostanza chimica di prova che riflette una inibizione del 50% dell'NRU cellulare (EC₅₀). A tale scopo si applica una qualunque procedura di regressione non lineare (preferibilmente una funzione di Hill o la regressione logistica) ai dati concentrazione-risposta, oppure si utilizzano altre procedure di adeguamento (14). Prima di utilizzare una EC₅₀ per ulteriori calcoli occorre controllare in modo adeguato la qualità dell'adattamento alla rappresentazione grafica. Alternativamente possono essere impiegati metodi di adattamento alla rappresentazione grafica per calcolare l'EC₅₀. In questo caso si raccomanda l'uso di carte di probabilità (scala x: log, scala y: probit), poiché in molti casi la funzione concentrazione-risposta diventerà quasi lineare dopo questa trasformazione.

2.3 VALUTAZIONE DEI RISULTATI (MODELLI DI PREDITTIVITÀ)

2.3.1 *Modello di predittività versione 1: PIF*

Se si ottengono curve concentrazione-risposta complete sia in presenza (+UVA) che in assenza (-UVA) di luce, il fattore di fotoirritazione (PIF) si calcola tramite la formula seguente:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Un PIF < 5 non predice alcun potenziale fototossico, mentre un PIF ≥ 5 predice un potenziale fototossico.

Se una sostanza chimica è citotossica solo +UVA e non è citotossica al test -UVA, non è possibile calcolare il PIF, sebbene si tratti di un risultato che indica un potenziale fototossico. In tali casi è possibile calcolare un "> PIF" se il test di citotossicità (-UV) viene eseguito fino alla concentrazione di prova più elevata (C_{max}) e tale valore viene usato per calcolare il "> PIF":

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Se è possibile ottenere solo un "> PIF", qualunque valore >1 predice un potenziale fototossico.

Se non è possibile calcolare né l'EC₅₀ (-UV) né l'EC₅₀ (+UV) a causa del fatto che una sostanza chimica non risulta essere citotossica fino alla più alta concentrazione di prova, questo indica l'assenza di potenziale fototossico. In tali casi per caratterizzare il risultato si utilizza un formale "PIF = *1"

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{\max}(-UV)}{C_{\max}(+UV)}$$

Se è possibile ottenere solo un "PIF = *1", ciò non predice alcun potenziale fototossico.

Nei casi (b) e (c), ai fini della predittività del potenziale fototossico è necessario tenere in debita considerazione le concentrazioni ottenute al test di fototossicità in vitro 3T3 NRU.

2.3.2 *Modello di predittività versione 2: MPE*

Alternativamente è possibile applicare una nuova versione del modello per prevedere il potenziale fototossico, sviluppata in base ai dati dello studio di validazione UE/COLIPA (15) e testata in cieco in un successivo studio sulla fototossicità in vitro delle sostanze chimiche a filtro UV (13). Tale modello sopperisce ai limiti del modello PIF nei casi in cui è impossibile ottenere un'EC₅₀. Il modello utilizza il "Mean Photo Effect" (MPE), una misura basata sul confronto delle curve complete concentrazione-risposta. Per l'applicazione del modello MPE la Humboldt Universität di Berlino ha sviluppato un software disponibile gratuitamente.

2.4 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Un risultato positivo al test di fototossicità in vitro 3T3 NRU (PIF ≥ 5 o MPE ≥ 0,1) indica che la sostanza di prova ha un potenziale fototossico. Se si ottiene tale risultato a concentrazioni inferiori a 10 µg/ml, è altresì probabile che la sostanza chimica di prova si comporti da fototossina in varie condizioni di esposizione in vivo. Se si ottiene un risultato positivo solo alla concentrazione di prova più elevata (100 µg/mL), possono essere necessarie ulteriori considerazioni per la valutazione del rischio o del potere fototossico, quali dati sulla penetrazione, l'assorbimento e il possibile accumulo della sostanza chimica nella cute, oppure l'analisi della sostanza in un test alternativo di conferma, ad esempio impiegando un modello di cute umana in vitro.

Un risultato negativo al test di fototossicità in vitro 3T3 NRU (PIF < 5 o MPE < 0,1) indica che la sostanza di prova non è fototossica per le cellule di mammifero in coltura nelle condizioni testate. Nei casi in cui è stato possibile provare la sostanza chimica fino alla concentrazione più elevata (100 µg/ml) un risultato negativo indica che tale sostanza non ha potenziale fototossico e la fototossicità in vivo può essere considerata improbabile. Nei casi in cui si ottengono identiche risposte tossicità-concentrazione (EC₅₀+UV e EC₅₀-UV) a concentrazioni inferiori, l'interpretazione dei dati sarebbe la stessa. Diversamente, se non viene dimostrata tossicità (+UV e -UV) e se la solubilità in acqua limita le concentrazioni a valori inferiori a 100 µg/ml, allora può essere messa in dubbio la compatibilità della sostanza di prova con il saggio e va presa in considerazione l'idea di eseguire prove di conferma (ad esempio usando un modello di cute in vitro o un modello di cute ex vivo o un test in vivo).

3 **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL TEST EFFETTUATO

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica di prova:

- dati di identificazione e numero CAS, se noto
- caratteristiche fisiche e purezza
- proprietà fisicochimiche rilevanti per l'esecuzione dello studio
- stabilità e fotostabilità, se note

Solvente:

- motivazione della scelta del solvente
- solubilità della sostanza chimica di prova in questo solvente
- percentuale di solvente presente nel terreno di trattamento (EBSS o PBS)

Cellule:

- tipo e origine
- assenza di micoplasmi
- numero di passaggi delle cellule, se noto
- sensibilità delle cellule agli UVA, determinata con gli strumenti per irradiazione usati nel test di fototossicità in vitro 3T3 NRU

Condizioni di esecuzione del test (a); *incubazione prima e dopo il trattamento:*

- tipo e composizione del terreno di coltura
- condizioni di incubazione (concentrazione di CO₂, temperatura, umidità)
- durata dell'incubazione (pre-trattamento, post-trattamento)

Condizioni di esecuzione del test (b); *trattamento con la sostanza chimica:*

- criteri di scelta delle concentrazioni della sostanza chimica di prova usata sia in presenza che in assenza di irradiazione UV/visibile
- in caso di solubilità limitata della sostanza chimica di prova e assenza di citotossicità, motivi della scelta di una concentrazione più elevata
- tipo e composizione del terreno di trattamento (soluzione salina tampone)
- durata del trattamento chimico

Condizioni di esecuzione del test (c); *irradiazione:*

- motivo della scelta della fonte di luce utilizzata nel test
- caratteristiche di irradiazione spettrale della fonte di luce
- caratteristiche di trasmissione / assorbimento del/i filtro/i usato/i
- caratteristiche del radiometro e particolari sulla sua calibrazione
- distanza della fonte di luce dal sistema di prova
- irradiazione UVA a tale distanza, espresso in mW/cm²
- durata dell'esposizione alla luce UV/visibile
- dose UVA (irradiazione × tempo), espressa in J/cm²
- temperatura delle colture cellulari durante l'irradiazione e delle colture cellulari mantenute in oscurità

Condizioni di esecuzione del test (d); *prova NRU*

- composizione del terreno al rosso neutro
- durata dell'incubazione nel rosso neutro
- condizioni di incubazione (concentrazione di CO₂, temperatura, umidità)
- condizioni di estrazione del rosso neutro (estraente, durata)
- lunghezza d'onda usata per la lettura spettrofotometrica della densità ottica del rosso neutro
- seconda lunghezza d'onda (riferimento), se utilizzata
- contenuto del bianco spettrofotometrico, se utilizzato

Risultati

- vitalità cellulare ottenuta a ciascuna concentrazione della sostanza chimica di prova, espressa in vitalità percentuale media dei controlli
- curve concentrazione-risposta (concentrazione della sostanza chimica di prova vs. vitalità cellulare relativa), ottenuta negli esperimenti simultanei +UVA e -UVA
- analisi dei dati delle curve concentrazione-risposta: se possibile, computo/calcolo dell'EC₅₀ (+UVA) e dell'EC₅₀ (-UVA)
- confronto delle due curve concentrazione-risposta ottenute in presenza e in assenza dell'irradiazione UVA/visibile, o tramite calcolo del PIF, o tramite calcolo dell'MPE
- classificazione del potenziale fototossico
- criteri di accettazione del test (a), *controllo negativo simultaneo:*
 - vitalità assoluta (densità ottica dell'estratto di rosso neutro) delle cellule irradiate e non irradiate
 - dati storici del controllo negativo, deviazione media e standard
- criteri di accettazione del test (b), *controllo positivo simultaneo:*
 - EC₅₀(+UVA) e EC₅₀(-UVA) e PIF della sostanza chimica di controllo positiva
 - dati storici riguardanti la sostanza chimica di controllo positiva: EC₅₀(+UVA) e EC₅₀(-UVA) e PIF, deviazione media e standard

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

1. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro* **8**, 793-796.
2. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA **26**, 7-8.
3. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998) EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in Vitro* **12**, 305-327.
4. OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods - *OECD Publications Office*, Paris, 1996.
5. Lovell W. W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxicology in Vitro* **7**, 95-102.
6. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research progress in organic, biological and medicinal chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
7. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. e Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA **22**, 314-348.
8. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of photobiology"; edited by KC Smith. Plenum Press, New York; 2nd edition, pp. 79-110.
9. Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **24**, 119-124.
10. Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996). Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology"; edited by FN Marzulli and HI Maibach. Published by Taylor & Francis, Washington DC; 5th Edition, pp. 515-530.
11. Tyrrell R. M. and Pidoux M (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Research* **47**, 1825-1829.
12. ZEBET / ECVAM / COLIPA - Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test. Drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
13. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998). A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test. ATLA **26**, 679-708.
14. Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995) Mathematical modelling of cellular responses to external signals. *Journal of Biological Systems* **3**, 127-138.
15. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA **25**, 445-462.

ALLEGATO 1

Ruolo del test di fototossicità 3T3 NRU in un sistema sequenziale di test di fototossicità delle sostanze chimiche

