

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 473 (2016) e fa parte di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. È stato elaborato un documento OCSE contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida (1).

La prova in vitro di aberrazione cromosomica è destinata ad identificare le sostanze chimiche che causano aberrazioni cromosomiche strutturali in una coltura di cellule di mammifero (2) (3) (4). Le aberrazioni strutturali possono essere di due tipi: cromosomiche o cromatidiche. Nei test di aberrazione cromosomica in vitro può verificarsi poliploidia (compresa l'endoreduplicazione). Se è vero che gli aneugeni possono provocare poliploidia, quest'ultima di per sé non indica un potenziale aneugenico e può semplicemente rivelare una perturbazione del ciclo cellulare o citotossicità (5). Questa prova non è destinata a misurare l'aneuploidia. Per il rilevamento dell'aneuploidia si raccomanda un test del micronucleo in vitro (6).

Nella prova in vitro di aberrazione cromosomica si possono usare colture di linee cellulari stabilizzate o colture cellulari primarie di origine umana o di roditori. Le cellule devono essere scelte in funzione della capacità di crescita in coltura, della stabilità del cariotipo (compreso il numero dei cromosomi) e della frequenza delle aberrazioni cromosomiche spontanee (7). Attualmente i dati disponibili non consentono di elaborare raccomandazioni solide ma rivelano l'importanza di considerare, al momento di valutare i rischi chimici: lo stato della p53, la stabilità genetica (del cariotipo), la capacità di riparazione del DNA e l'origine (da roditori piuttosto che umane) delle cellule scelte per la sperimentazione. Gli utilizzatori del presente metodo di prova sono pertanto incoraggiati a valutare l'influenza di queste ed altre caratteristiche cellulari sul comportamento di una linea cellulare nel rilevare l'induzione di aberrazioni cromosomiche, in funzione dell'evoluzione delle conoscenze in questo campo.

Le definizioni utilizzate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

Le prove in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno che le cellule non siano metabolicamente compatibili con le sostanze chimiche in esame. Il sistema esogeno di attivazione metabolica non simula perfettamente le condizioni in vivo. Occorre adoperarsi per evitare condizioni che potrebbero portare a falsi risultati positivi, vale a dire danni cromosomici non causati da un'interazione diretta tra le sostanze chimiche in esame e i cromosomi; tali condizioni comprendono le variazioni di pH o di osmolalità (8) (9) (10), l'interazione con gli ingredienti del mezzo (11) (12) o livelli eccessivi di citotossicità (13) (14) (15) (16).

La prova è utilizzata per individuare aberrazioni cromosomiche che possono derivare da eventi clastogenici. L'analisi dell'induzione di aberrazioni cromosomiche deve avvenire utilizzando cellule in metafase. È quindi essenziale che le cellule raggiungano la mitosi sia nelle colture trattate sia in quelle non trattate. Possono essere necessari adattamenti specifici di questo metodo di prova, non descritti in questa sede, per i nanomateriali di sintesi.

Prima dell'uso del metodo di prova su una miscela, per la generazione di dati per un determinato scopo normativo, occorre esaminare se, e in caso affermativo perché, può fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Le colture di cellule umane o di altro mammifero sono esposte alla sostanza chimica in esame con e senza una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno di utilizzare cellule con un'adeguata capacità metabolizzante (cfr. il paragrafo 13). Dopo l'inizio dell'esposizione alla sostanza chimica in esame, le colture cellulari sono trattate, a intervalli opportunamente predefiniti, con un inibitore della metafase (per esempio Colcemid o colchicina), raccolte e sottoposte a un processo di colorazione; le cellule in metafase sono esaminate al microscopio per determinare la presenza di aberrazioni di tipo cromatidico e cromosomiche.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Cellule

Si possono utilizzare varie linee cellulari (ad esempio cellule di ovario di criceto cinese (CHO), di polmone di criceto cinese V79, di polmone di criceto cinese (CHL)/IU, TK 6) o colture cellulari primarie, fra cui linfociti del sangue periferico umano o di altri mammiferi (7). La scelta delle linee cellulari deve essere scientificamente motivata. Nel caso di impiego di cellule primarie, per motivi attinenti al benessere degli animali occorre prendere in considerazione l'uso di cellule di origine umana ove possibile, prelevate in conformità dei principi e delle norme etiche pertinenti. I linfociti del sangue periferico umano devono essere ottenuti da soggetti giovani (circa 18-35 anni di età), non fumatori, non affetti da malattie note e non esposti recentemente ad agenti genotossici (ad esempio sostanze chimiche o radiazioni ionizzanti) a livelli tali da aumentare l'incidenza di base di aberrazioni cromosomiche. In tal modo si garantisce che l'incidenza di base di aberrazioni cromosomiche rimanga lieve e omogenea. L'incidenza di base di aberrazioni cromosomiche aumenta con l'età e questa tendenza è più marcata nelle donne che negli uomini (17) (18). Se si raccolgono cellule da più donatori, il numero dei donatori dev'essere indicato. È necessario dimostrare che le cellule si sono divise fra l'inizio del trattamento con la sostanza chimica in esame e il prelievo. Le colture cellulari vengono mantenute in una fase di crescita esponenziale (linee cellulari) o stimolate a dividersi (colture primarie di linfociti), per esporre le cellule in diversi stadi del ciclo cellulare, essendo potenzialmente ignota la sensibilità dei diversi stadi delle cellule alle sostanze chimiche in esame. In generale, le cellule primarie che per dividersi devono essere stimolate con agenti mitogenici non sono più sincronizzate durante l'esposizione alla sostanza chimica in esame (ad esempio linfociti umani dopo 48 ore dalla stimolazione mitogenica). L'uso di cellule sincronizzate durante il trattamento non è raccomandato, ma può essere ammissibile se giustificato.

Mezzo e condizioni di coltura

Le colture vanno mantenute in mezzi di coltura e condizioni di incubazione (recipienti di coltura, atmosfera umidificata al 5 % di CO₂ se del caso, temperatura di incubazione di 37 °C) adeguati. Occorre controllare periodicamente la stabilità del numero modale dei cromosomi e l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle linee cellulari (7) (19); non si devono usare cellule contaminate o che presentano modifiche del numero modale dei cromosomi. Occorre stabilire la durata normale del ciclo cellulare delle linee cellulari o delle colture primarie utilizzate nel laboratorio di prova, che deve essere coerente con le caratteristiche cellulari pubblicate (20).

Preparazione delle colture

Linee cellulari: le cellule provenienti da colture primarie vengono inoculate in un terreno di coltura ad una densità tale da consentire alle cellule in sospensione o in monostrati di continuare a crescere in maniera esponenziale fino al momento del prelievo (occorre, ad esempio, evitare che le cellule in crescita in monostrati raggiungano la confluenza).

Linfociti: sangue intero trattato con un anticoagulante (ad esempio eparina) o linfociti isolati sono posti in un terreno di coltura (ad esempio per 48 ore nel caso di linfociti umani) contenente un mitogeno [ad esempio fitoemoagglutinina (PHA) nel caso di linfociti umani] per ridurre la divisione cellulare prima dell'esposizione alla sostanza chimica in esame.

Attivazione metabolica

Se si utilizzano cellule prive di un'adeguata capacità di attivazione metabolica endogena si deve ricorrere a sistemi di attivazione metabolica esogeni. Il sistema più comunemente usato, raccomandato in tutti i casi salvo alternativa motivata, è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), prelevata dal fegato di roditori (solitamente ratti) trattati con induttori enzimatici come Aroclor 1254 (21) (22) (23) o con una combinazione di fenobarbitone e β -naftoflavone (24) (25) (26) (27) (28) (29). Quest'ultima combinazione è conforme alla convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (30) e ha dimostrato di essere tanto efficace quanto l'Aroclor 1254 nell'indurre ossidasi a funzione mista (24) (25) (26) (28). Solitamente la frazione S9 viene usata a concentrazioni comprese tra 1 % e 2 % (v/v), ma può essere aumentata al 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. Occorre evitare, durante il trattamento, l'impiego di prodotti che riducono il coefficiente mitotico, soprattutto prodotti di complessazione del calcio (31). La scelta del tipo e della concentrazione del sistema di attivazione metabolica esogeno o dell'induttore metabolico utilizzato può essere influenzata dalla classe delle sostanze chimiche in esame.

Preparazione della sostanza chimica in esame

Le sostanze chimiche in esame solide devono essere preparate in adeguati solventi e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule (cfr. il paragrafo 23). Le sostanze chimiche in esame liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento della coltura stessa. Le sostanze chimiche in esame gassose o volatili devono essere sottoposte alla prova modificando adeguatamente i protocolli standard (trattamento in recipienti di coltura ermetici) (33) (34). Occorre preparare la sostanza chimica in esame subito prima del trattamento, salvo se i dati sulla stabilità dimostrano che la conservazione è un'alternativa accettabile.

Condizioni sperimentali

Solventi

La scelta del solvente deve favorire l'ottimizzazione della solubilità delle sostanze chimiche in esame, senza nuocere alla conduzione del saggio (ad esempio influenzando la crescita cellulare), compromettere l'integrità della sostanza chimica in esame, reagire con recipienti di coltura o pregiudicare il sistema di attivazione metabolica. Si raccomanda di prendere in considerazione in primo luogo, se possibile, l'uso di un solvente (o mezzo di coltura) acquoso. Solventi di uso consolidato sono, ad esempio, l'acqua o il dimetilsolfossido. In generale è opportuno che i solventi organici non superino l'1 % (v/v) e quelli acquosi (soluzione fisiologica o acqua) il 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. Qualora si utilizzino solventi di uso non consolidato (ad esempio etanolo o acetone), il loro uso dovrebbe essere suffragato da dati che ne comprovino la compatibilità con le sostanze chimiche in esame e con il sistema di prova e l'assenza di tossicità genetica alla concentrazione usata. In assenza di tali dati, è importante includere controlli non trattati (cfr. l'appendice 1) per dimostrare che il solvente scelto non induce effetti nocivi o clastogenici.

Misurazione della proliferazione cellulare e della citotossicità e scelta delle concentrazioni di trattamento

Nel determinare la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame, occorre evitare le concentrazioni che hanno la capacità di produrre falsi risultati positivi, come quelle che causano eccessiva citotossicità (cfr. il paragrafo 22), precipitazione nel terreno di coltura (cfr. il paragrafo 23) o variazioni marcate del pH o osmolalità (cfr. il paragrafo 5). Se la sostanza chimica in esame provoca una variazione marcata del pH del mezzo al momento dell'aggiunta, il pH può essere adeguato tamponando il terreno di coltura finale in modo da evitare falsi risultati positivi e mantenere adeguate condizioni di coltura.

Occorre misurare la proliferazione cellulare per garantire che un numero sufficiente di cellule trattate abbia raggiunto la mitosi durante la prova e che i trattamenti siano condotti ad adeguati livelli di citotossicità (cfr. i paragrafi 18 e 22). La citotossicità deve essere determinata con e senza attivazione metabolica nel test principale, sulla base di un indicatore adeguato della morte e della crescita cellulare. Mentre la valutazione della citotossicità in un saggio iniziale può essere utile per definire meglio le concentrazioni da utilizzare per il test principale, l'effettuazione di un saggio iniziale non è obbligatoria. Se viene eseguito, non deve sostituire la misurazione della citotossicità nel test principale.

Il raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) o l'aumento relativo delle conte cellulari (RICC) sono metodi adeguati per la valutazione della citotossicità nella prova citogenetica (13) (15) (35) (36) (55) (cfr. l'appendice 2 per le formule). In caso di trattamento a lungo termine e fasi di campionamento dopo l'inizio del trattamento superiori a 1,5 volte la durata normale del ciclo cellulare (ossia oltre 3 cicli cellulari in totale), l'RPD potrebbe sottostimare la citotossicità (37). In tali circostanze l'RICC potrebbe essere una misura migliore, ma una stima utile si potrebbe ottenere anche valutando la citotossicità mediante l'RPD dopo 1,5 cicli cellulari normali.

Per i linfociti in colture primarie, il coefficiente mitotico (MI) è una misura degli effetti citotossici/citostatici, ma è anche influenzato dal tempo trascorso fra il trattamento e la misurazione, dal mitogeno usato e dalla possibile interruzione del ciclo cellulare. Tuttavia, il coefficiente mitotico è accettabile perché altre misurazioni della citotossicità potrebbero essere onerose e di difficile esecuzione e potrebbero non risultare adeguate alla popolazione interessata di linfociti in crescita in risposta alla stimolazione con PHA.

Mentre RICC e RPD per le linee cellulari e MI per la coltura primaria di linfociti sono i parametri raccomandati di citotossicità, altri indicatori (ad esempio l'integrità delle cellule, l'apoptosi, la necrosi, il ciclo cellulare) potrebbero fornire utili informazioni aggiuntive.

Occorre valutare almeno tre concentrazioni di prova (non compreso il solvente e i controlli positivi) che soddisfano i criteri di accettabilità (adeguata citotossicità, numero di cellule, ecc.). A prescindere dal tipo di cellula (linee cellulari o colture primarie di linfociti), ciascuna coltura realizzata singolarmente o in più repliche può essere utilizzata per ciascuna concentrazione di prova. È consigliato l'uso di colture in duplicato, ma colture singole sono accettabili a condizione di analizzare lo stesso numero totale di cellule sia nel caso di coltura singola sia nel caso di colture in duplicato. L'uso di colture singole è particolarmente indicato quando si valutano più di 3 concentrazioni (cfr. il paragrafo 31). I risultati ottenuti con colture replicate indipendenti con una determinata concentrazione possono essere aggregati per l'analisi dei dati (38). Per le sostanze chimiche di prova che dimostrino tossicità assente o debole, sono solitamente indicati intervalli di concentrazione di un fattore da 2 a 3. In caso di citotossicità, le concentrazioni selezionate per la prova devono coprire una gamma comprendente quella che ha prodotto la citotossicità di cui al paragrafo 22 e concentrazioni alle quali la citotossicità è debole o assente. Molte sostanze chimiche in esame presentano curve di concentrazione-risposta accentuate e al fine di ottenere dati a bassa o debole citotossicità o di studiare la relazione dose-risposta nel dettaglio, sarà necessario ricorrere a concentrazioni separate fra loro da intervalli minori e/o a più di tre concentrazioni (colture singole o replicate), in particolare nelle situazioni in cui è necessario ripetere l'esperimento (cfr. il paragrafo 47).

Se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, la concentrazione più elevata deve puntare a raggiungere il $55 \pm 5\%$ di citotossicità sulla base dei parametri di citotossicità raccomandati (ossia la riduzione di RICC e RPD per le linee cellulari e la riduzione di MI per le colture primarie di linfociti al $45 \pm 5\%$ nel controllo negativo parallelo). Occorre interpretare con cautela risultati positivi ottenuti nel solo segmento superiore di tale intervallo di citotossicità al $55 \pm 5\%$ (13).

Per le sostanze chimiche scarsamente solubili non citotossiche a concentrazioni inferiori alla concentrazione minima insolubile, la più elevata concentrazione analizzata dovrebbe produrre torbidità o la formazione di un precipitato visibile a occhio nudo o con l'aiuto di un microscopio invertito, alla fine del trattamento con la sostanza chimica di prova. Anche se la citotossicità si verifica a concentrazioni superiori a quella minima insolubile, è indicato effettuare la prova a una sola concentrazione che produce torbidità o un precipitato visibile, perché il precipitato può falsare gli effetti. Alla concentrazione che produce un precipitato, occorre adoperarsi per garantire che il precipitato non interferisca nello svolgimento della prova (ad esempio mediante colorazioni o abrasioni). Può essere utile determinare la solubilità nel terreno di coltura prima del test.

Se non si osserva nessun precipitato o nessuna citotossicità limitante, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari al valore più basso fra 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml (39) (40) (41). Se la sostanza chimica in esame non ha una composizione definita — quale ad esempio una sostanza di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici (UVCB) (42) o estratti dall'ambiente, ecc. — la concentrazione massima potrebbe dover essere più elevata (ad esempio 5 mg/ml), in mancanza di sufficiente citotossicità, per aumentare la concentrazione di ciascuna componente. Va tuttavia rilevato che tali requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici per uso umano (43).

Controlli

Occorre anche effettuare controlli negativi paralleli (cfr. il paragrafo 15), con il solo solvente sul terreno di coltura, trattato allo stesso modo delle colture di trattamento, per ogni fase di raccolta.

Controlli positivi paralleli sono necessari per dimostrare la capacità del laboratorio di individuare clastogeni alle condizioni del protocollo di prova utilizzato e l'efficacia del sistema di attivazione metabolica esogeno, se del caso. Esempi di controlli positivi sono indicati nella tabella 1 in appresso. Si possono utilizzare sostanze chimiche alternative di controllo, se giustificate. Poiché test in vitro su cellule di mammiferi per tossicità genetica sono sufficientemente standardizzati, l'uso dei controlli positivi può limitarsi a un clastogeno che richiede attivazione metabolica. A condizione che si svolga contemporaneamente alla prova senza attivazione con la stessa durata di trattamento, quest'unico risultato di controllo positivo dimostrerà sia l'attività del sistema di attivazione metabolica sia la capacità di risposta del sistema di prova. Tuttavia, il trattamento a lungo termine (senza S9) richiede l'effettuazione di un proprio controllo positivo, in quanto la durata del trattamento differisce da quella della prova con attivazione metabolica. Ciascun controllo positivo deve essere utilizzato a una o più concentrazioni da cui ci si attende un aumento riproducibile e rilevabile rispetto ai valori di fondo, per dimostrare la sensibilità del sistema di prova (ossia effetti chiari che tuttavia non rivelino immediatamente allo sperimentatore l'identità dei vetrini codificati), e la risposta non deve essere compromessa da una citotossicità superiore ai limiti specificati nel metodo di prova.

Tabella 1.

Sostanze chimiche di riferimento raccomandate per la valutazione della competenza dei laboratori e per la selezione dei controlli positivi.

Categoria	Sostanza chimica	CASRN
1. Clastogeni attivi senza attivazione metabolica		
	Metansolfonato di metile	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	4-nitrochinolina-N-ossido	56-57-5
	Citosina arabinoside	147-94-4
2. Clastogeni che richiedono attivazione metabolica		
	Benzo(a)pirene	50-32-8
	Ciclofosfamide	50-18-0

SVOLGIMENTO DEL METODO

Trattamento con la sostanza chimica in esame

Le cellule in proliferazione sono trattate con la sostanza chimica in esame in presenza e in assenza di un sistema di attivazione metabolica.

Raccolta delle colture

Ai fini di una valutazione rigorosa, necessaria per concludere un esito negativo, occorre rispettare tutte e tre le seguenti condizioni sperimentali utilizzando un trattamento di breve durata con e senza attivazione metabolica e un trattamento di lunga durata senza attivazione metabolica (cfr. i paragrafi 43, 44 e 45):

- si espongono le cellule alla sostanza chimica in esame, senza attivazione metabolica, per 3-6 ore e si procede al campionamento quando sia trascorso un periodo equivalente a circa una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale dall'inizio del trattamento (18);
- si espongono le cellule alla sostanza chimica in esame, con attivazione metabolica, per 3-6 ore e si procede al campionamento quando sia trascorso un periodo equivalente a circa una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale dall'inizio del trattamento (18);
- si espongono le cellule in modo continuo senza attivazione metabolica fino al campionamento dopo un periodo equivalente a circa una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale. Alcune sostanze chimiche (ad esempio analoghi di nucleosidi) possono essere individuate più facilmente con tempi di trattamento/campionamento superiori a una volta e mezzo la durata del ciclo cellulare (24).

Nel caso in cui una qualsiasi delle suddette condizioni sperimentali porti ad un risultato positivo, può non essere necessario esaminare gli altri regimi di trattamento.

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. Nei monostrati possono essere presenti cellule mitotiche (identificabili perché di forma tonda e in fase di distacco dalla superficie) al termine del trattamento di 3-6 ore. Poiché tali cellule mitotiche si staccano facilmente, potrebbero andare perdute al momento della rimozione del terreno di coltura contenente la sostanza chimica in esame. Se si rileva un aumento sostanziale del numero di cellule mitotiche rispetto ai controlli, tale da indicare il probabile arresto mitotico, occorre allora prelevare le cellule mediante centrifugazione e aggiungerle nuovamente alle colture per evitare di perdere cellule in mitosi, e quindi a rischio di aberrazione cromosomica, al momento della raccolta.

Analisi

Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio per l'aberrazione cromosomica. Poiché le procedure di fissaggio provocano spesso la perdita di cromosomi in una parte delle cellule in metafase, le cellule classificate devono contenere un numero di centromeri pari al numero modale ± 2 .

Occorre classificare almeno 300 metafasi ben spaziate per ogni concentrazione e per ogni controllo, per rilevare un risultato chiaramente negativo per la sostanza chimica in esame (cfr. il paragrafo 45). Se si usano colture replicate, le 300 cellule devono essere divise equamente tra le repliche. Se si usano colture singole per ogni concentrazione (cfr. il paragrafo 21), occorre classificare almeno 300 metafasi ben spaziate in ogni coltura singola. L'analisi di 300 cellule comporta il vantaggio di aumentare la potenza statistica della prova; inoltre valori pari a zero saranno rari (stimati dell'ordine del 5 %) (44). È possibile ridurre il numero di metafasi classificate se si osserva un numero elevato di cellule con aberrazioni cromosomiche e la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva.

Le cellule che presentano una o più aberrazioni cromosomiche strutturali con e senza gap devono essere classificate. Le rotture e i gap sono definiti nell'appendice 1 conformemente a (45) (46). Occorre registrare separatamente le aberrazioni cromatidiche e quelle cromosomiche e classificarle in sottotipi (rotture, scambi). Le procedure in uso presso il laboratorio devono assicurare che l'analisi delle aberrazioni cromosomiche sia effettuata da analisti ben preparati e sottoposta a valutazione inter pares, se del caso.

Sebbene la prova sia destinata a rivelare aberrazioni cromosomiche strutturali, è importante registrare le frequenze di eventuali casi di poliploidia e di endoriduplicazione (cfr. il paragrafo 2).

Competenza del laboratorio

Al fine di verificare sufficiente esperienza con la prova prima del suo impiego corrente, il laboratorio deve avere eseguito una serie di esperimenti con sostanze chimiche positive di riferimento che agiscono attraverso meccanismi diversi e vari controlli negativi (con diversi solventi/veicoli). Tali risposte dei controlli, positive e negative, devono essere coerenti con la letteratura scientifica. Ciò non si applica ai laboratori che hanno già maturato un'esperienza, vale a dire che dispongono di una banca di dati storici quale definita al paragrafo 37.

Occorre analizzare una selezione di sostanze chimiche di controllo a esito positivo (cfr. la tabella 1 al paragrafo 26) con trattamenti brevi e lunghi in assenza di attivazione metabolica e anche con trattamento breve in presenza di attivazione metabolica, al fine di dimostrare la capacità di individuare sostanze chimiche con proprietà clastogeniche e determinare l'efficacia del sistema di attivazione metabolica. Occorre scegliere una serie di concentrazioni delle sostanze chimiche selezionate per fornire aumenti riproducibili e correlati alla concentrazione rispetto ai valori di fondo, dimostrando così la sensibilità e la gamma dinamica del sistema di prova.

Dati storici di controllo

Il laboratorio deve stabilire:

- gamma e distribuzione dei controlli positivi storici,
- gamma e distribuzione dei controlli negativi storici (non trattati, trattati con solvente).

All'acquisizione dei primi dati di distribuzione dei controlli negativi storici, è necessario che i controlli negativi paralleli siano coerenti con i dati di controllo pubblicati, se esistenti. Con l'aumento dei dati sperimentali aggiunti alla distribuzione dei controlli, i controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % di tale distribuzione (44) (47). La banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio deve inizialmente essere costituita con un minimo di 10 esperimenti ma preferibilmente con almeno 20 esperimenti svolti in condizioni sperimentali analoghe. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali diagrammi di controllo (ad esempio carte C o carte X medio (48)), per rilevare la variabilità dei loro dati di controllo positivi e negativi e dimostrare che la metodologia è "sotto controllo" nel laboratorio (44). Ulteriori raccomandazioni su come sviluppare e utilizzare i dati storici (cioè i criteri per l'inclusione e l'esclusione di dati nelle serie storiche e i criteri di accettabilità per un determinato esperimento) sono reperibili nella letteratura scientifica (47).

Eventuali modifiche apportate al protocollo sperimentale devono essere considerate in base alla loro coerenza con le esistenti banche dati di controlli storici del laboratorio. L'esistenza di incongruenze significative deve portare alla creazione di una nuova banca dati di controlli storici.

I dati sui controlli negativi devono comprendere l'incidenza di cellule con aberrazioni cromosomiche da coltura singola o dalla somma di colture replicate, come descritto nel paragrafo 21. I controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % della distribuzione della banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio (44) (47). Qualora i dati dei controlli negativi paralleli non rientrino nei limiti del controllo al 95 %, possono essere accettabili per l'inserimento nella distribuzione dei controlli storici purché non siano valori erratici estremi e sia provato che il sistema di prova è "sotto controllo" (cfr. il paragrafo 37) e che non si sono verificati errori tecnici o umani.

DATI E RELAZIONE

Presentazione dei risultati

Occorre valutare la percentuale di cellule con una o più aberrazioni cromosomiche strutturali. Occorre elencare separatamente le aberrazioni cromosomiche e quelle cromatidiche e classificarle in sottotipi (rottture, scambi) con l'indicazione del numero e della frequenza per le colture sperimentali e di controllo. I gap devono essere registrati e indicati separatamente nella relazione, ma non inclusi nella frequenza totale delle aberrazioni. Le percentuali di poliploidia e/o di cellule endoriduplicate sono segnalate se verificate.

Occorre riportare anche le misurazioni di citotossicità condotte in parallelo per tutte le colture trattate di controllo negativo e positivo nei principali test di aberrazione.

Occorre fornire dati sulle singole colture. Tutti i dati devono essere riassunti in tabelle.

Criteri di accettabilità

L'accettazione di una prova è basata sui seguenti criteri:

- il controllo negativo parallelo è considerato accettabile per inserimento nella banca dati sui controlli negativi storici di laboratorio come descritto al paragrafo 39.
- I controlli positivi paralleli (cfr. il paragrafo 26) devono indurre risposte compatibili con quelle generate nella banca dati dei controlli positivi storici e produrre un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo.
- Devono essere soddisfatti i criteri di proliferazione cellulare nel controllo con solvente (paragrafi 17 e 18).
- Tutte e tre le condizioni sperimentali sono state testate a meno che una abbia portato a risultati positivi (cfr. il paragrafo 28).
- Un adeguato numero di cellule e concentrazioni è analizzabile (paragrafi 31 e 21).
- I criteri di selezione della concentrazione massima sono conformi a quelli descritti ai paragrafi 22, 23 e 24.

Analisi e interpretazione dei risultati

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 28):

- a) almeno una delle concentrazioni di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo;
- b) l'aumento è correlato alla dose somministrata se valutato con un'adeguata analisi della tendenza;
- c) vi sono risultati che non rientrano nella distribuzione dei dati dei controlli negativi storici (ad esempio limiti di controllo al 95 % di una distribuzione di Poisson; cfr. il paragrafo 39).

Se tutti i criteri sono soddisfatti, la sostanza chimica in esame è ritenuta in grado di indurre aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero coltivate nel sistema di prova. Raccomandazioni dei metodi statistici più appropriati sono reperibili nella letteratura scientifica (49) (50) (51).

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se, in tutte le condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 28):

- a) nessuna concentrazione di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo;

- b) non si verifica nessun aumento correlato alla dose somministrata se valutato con un'adeguata analisi della tendenza;
- c) tutti i risultati rientrano nella distribuzione dei dati dei controlli negativi storici (ad esempio limiti di controllo al 95 % di una distribuzione di Poisson; cfr. il paragrafo 39).

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero coltivate nel sistema di prova.

Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva o negativa.

In caso di risposta non chiaramente positiva o negativa come sopra descritto o per contribuire a stabilire la pertinenza biologica di un risultato, i dati devono essere valutati da esperti e/o mediante ulteriori indagini. Potrebbe essere utile analizzare nuove cellule (se appropriato) o ripetere un esperimento modificandone eventualmente le condizioni (ad esempio, intervallazione delle concentrazioni, altre condizioni di attivazione metabolica (ossia concentrazione S9 od origine S9)).

In rari casi, anche dopo ulteriori indagini, i dati non consentono di arrivare a una conclusione positiva o negativa e pertanto la risposta della sostanza chimica in esame è considerata ambigua.

Un aumento del numero di cellule poliploidi può significare che le sostanze chimiche in esame sono in grado di inibire processi mitotici e di indurre aberrazioni numeriche nei cromosomi (52). Un aumento del numero di cellule con cromosomi endoriduplicati può indicare che le sostanze chimiche in esame sono in grado di inibire la progressione del ciclo cellulare (53) (54) (cfr. il paragrafo 2). Pertanto, l'incidenza delle cellule poliploidi e quella delle cellule con cromosomi endoriduplicati devono essere registrate separatamente.

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame:

- origine, numero di lotto, data limite per l'uso, se disponibili;
- stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;
- misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura a cui è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza mono-componente:

- aspetto fisico, solubilità in acqua e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- identificazione chimica, quale nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica di eventuali impurità se opportuno e fattibile, ecc.

Sostanza multi-componente, UVCB e miscele:

- caratterizzarne, per quanto possibile, l'identità chimica (cfr. sopra), le proporzioni quantitative e le pertinenti proprietà fisico-chimiche dei componenti.

Solvente:

- motivazione della scelta del solvente;
- si dovrebbe indicare anche la percentuale di solvente nel terreno di coltura.

Cellule:

- tipo e origine delle cellule;
- caratteristiche del cariotipo e idoneità del tipo di cellula usato;
- assenza di micoplasma, per le linee cellulari;
- per le linee cellulari, informazioni sulla durata del ciclo cellulare, sui tempi di raddoppiamento o sull'indice di proliferazione;
- sesso dei donatori di sangue, età e pertinenti informazioni sul donatore, sangue intero o linfociti isolati, mitogeno usato;
- numero di passaggi, se disponibile, per le linee cellulari;
- metodi usati per la conservazione delle colture cellulari, per le linee cellulari;
- numero modale di cromosomi, per le linee cellulari.

Condizioni della prova:

- natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata di esposizione delle cellule;
- concentrazione della sostanza chimica in esame espressa come concentrazione finale nel terreno di coltura (ad esempio µg o mg/ml o mM del terreno di coltura);
- criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture: per esempio i dati relativi alla citotossicità e ai limiti di solubilità;
- composizione dei terreni di coltura, concentrazione di CO₂ se del caso, livello di umidità;
- concentrazione (e/o volume) del solvente e della sostanza chimica in esame aggiunti nel terreno di coltura;
- temperatura di incubazione;
- tempo di incubazione;
- durata del trattamento;
- momento della raccolta dopo il trattamento;
- densità delle cellule al momento dell'inoculazione, se del caso;
- tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica (fonte di S9, metodo di preparazione della miscela S9, concentrazione o volume della miscela S9 e di S9 nel terreno di coltura, controlli di qualità S9);
- sostanze di controllo positive e negative, concentrazioni finali per ciascuna delle condizioni di trattamento;
- metodi di preparazione dei vetrini e tecniche di colorazione utilizzati;
- criteri di accettabilità dei saggi;
- criteri di classificazione dei vetrini;
- numero di metafasi analizzate;
- metodi di misurazione della citotossicità;
- eventuali informazioni supplementari pertinenti per la citotossicità e metodo usato;
- criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;
- metodi utilizzati per determinare pH, osmolalità e precipitazione.

Risultati:

- numero di cellule trattate e numero di cellule raccolte per ciascuna coltura se sono utilizzate linee cellulari;
- misurazioni della citotossicità, ad esempio RPD, RICC, MI, altre osservazioni se del caso;
- informazioni sulla durata del ciclo cellulare, sui tempi di raddoppiamento o sull'indice di proliferazione in caso di linee cellulari;
- segni di precipitazione e momento della determinazione;
- definizione delle aberrazioni, compresi i gap;
- numero di cellule classificate, numero di cellule con aberrazioni cromosomiche e tipi di aberrazioni cromosomiche indicati separatamente per ciascuna coltura trattata e di controllo, con e senza gaps;
- eventuali cambiamenti di ploidia (cellule poliploidi e cellule con cromosomi endoriduplicati, indicate separatamente);
- relazione concentrazione-risposta, se possibile;
- dati sui controlli paralleli negativi (solvente) e positivi (concentrazioni e solventi);
- dati sui controlli storici negativi (solvente) e positivi, con intervalli, medie e deviazioni standard e limiti di controllo al 95 % della distribuzione, nonché il numero dei dati;
- analisi statistiche; valori p, se noti.

*Discussione dei risultati.**Conclusioni.*

BIBLIOGRAFIA

- (1) OCSE (2016), Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-15. ENV Publications, Series on Testing and Assessment, n. 234, OCSE, Parigi.
- (2) Evans, H.J. (1976), "Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pagg. 1-29
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (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, pagg. 427-432.
- (4) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pagg. 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), "Improving dose selection and identification of aneugens in the in vitro chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pagg. 318-327".
- (6) Capitolo B.49 del presente allegato, *Test del micronucleo in vitro con cellule di mammifero*.
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pagg. 147-204.

- (9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pagg. 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pagg. 789-886.
- (11) Long, L.H. *et al.* (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, pagg. 177-183.
- (12) Nessler, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pagg. 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pagg. 191-201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (2005), Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pagg. 1-256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pagg. 36-44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pagg. 316-326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pagg. 305-309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pagg. 95-106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pagg. 261-287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol. 12/3, pagg. 163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pagg. 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pagg. 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pagg. 83-90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix in vitro, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pagg. 277-290.
- (25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pagg. 55-65.

- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pagg. 175-177.
- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pagg. 85-88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on in vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pagg. 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, pagg. 51-59.
- (30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pagg. 225-8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pagg. 91-103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pagg. 795-801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pagg. 122-130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, pagg. 1-3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pagg. 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pagg. 86-87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pagg. 141-154.
- (39) OCSE (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the in vitro mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponibile su richiesta.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pagg. 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, pagg. 36-43.

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Available at: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OCSE (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris".
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. *et al.* (1990), "Metaphase chromosome aberration assays in vitro", in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pagg. 62-86.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pagg. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pagg. 1-175.
- (51) Richardson, C. *et al.* (1989), "Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pagg. 141-154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pagg. 29-46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pagg. 403-413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pagg. 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pagg. 139-149.
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dell'intero corredo di cromosomi (poliploidia).

Apoptosi: morte cellulare programmata caratterizzata da una serie di fasi che portano alla disintegrazione delle cellule in particelle legate alla membrana, le quali vengono poi eliminate mediante fagocitosi o "shedding" (clivaggio dei ricettori di membrana).

Proliferazione cellulare: aumento del numero di cellule dovuto alla divisione mitotica delle cellule.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Rottura cromatidica: discontinuità di un singolo cromatidio in cui vi è un'evidente disallineamento di uno dei cromatidi.

Gap cromatidico: regione non colorata (lesione acromatica) di un singolo cromatidio in cui vi è un disallineamento minimo del cromatidio.

Aberrazione di tipo cromatidico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromatidio 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.

Clastogeno: qualsiasi sostanza chimica che causa aberrazioni cromosomiche strutturali in popolazioni di cellule o organismi eucarioti.

Concentrazioni: si riferiscono alle concentrazioni finali della sostanza chimica in esame nel mezzo di coltura.

Citotossicità: per i saggi di cui al presente metodo di prova con linee cellulari, la citotossicità corrisponde a una riduzione del raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) o dell'aumento relativo del numero di cellule (RICC) delle cellule trattate rispetto al controllo negativo (cfr. il paragrafo 17 e l'appendice 2). per i saggi di cui al presente metodo di prova con colture primarie di linfociti, la citotossicità corrisponde a una riduzione del coefficiente mitotico (MI) delle cellule trattate rispetto al controllo negativo (cfr. il paragrafo 18 e l'appendice 2).

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.

Genotossico: termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rotture, delezioni, modifiche e collegamenti di nucleotidi, riarrangiamenti, mutazioni geniche, aberrazioni cromosomiche e aneuploidia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

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

Mitosi: divisione del nucleo cellulare, solitamente suddivisa in profase, prometafase, metafase, anafase e telofase.

Mutageno: un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomica).

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

Poliploidia: aberrazioni numeriche dei cromosomi che interessa l'intero corredo cromosomico di cellule o organismi, a differenza dall'aneuploidia, che invece interessa un solo cromosoma o più cromosomi, ma non l'intero corredo cromosomico.

Stato della p53: la proteina p53 partecipa alla regolazione del ciclo cellulare, all'apoptosi e alla riparazione del DNA. Le cellule carenti di proteine p53 funzionali, che non sono in grado di arrestare il ciclo cellulare o di eliminare cellule danneggiate tramite apoptosi o altri meccanismi (ad esempio induzione di riparazione del DNA) relativi alle funzioni della p53 in risposta ad alterazioni del DNA, dovrebbero essere teoricamente più soggette a mutazioni geniche o aberrazioni cromosomiche.

Aumento relativo delle conte cellulari (RICC): aumento del numero di cellule nelle colture esposte ad agenti chimici rispetto all'aumento nelle colture non trattate; il rapporto è espresso in percentuale.

Raddoppiamento relativo della popolazione (Relative Population Doubling, RPD): aumento del numero di raddoppiamenti della popolazione nelle colture esposte ad agenti chimici rispetto all'aumento nelle colture non trattate; il rapporto è espresso in percentuale.

Frazione S9 del fegato: supernatante di omogenato epatico centrifugato a 9 000 g, cioè estratto di fegato crudo.

Miscela S9: miscela di frazione S9 del fegato con cofattori necessari per l'attività degli enzimi metabolici.

Controllo con solvente: termine generico che designa le colture di controllo che ricevono unicamente il solvente utilizzato per disciogliere la sostanza chimica in esame.

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

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

Controllo non trattato: colture non sottoposte a trattamento (che non ricevono alcuna sostanza chimica in esame né solvente) ma preparate in parallelo e in modo identico alle colture esposte alla sostanza chimica in esame.

Appendice 2

FORMULE PER LA VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ

Coefficiente mitotico (MI):

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{Numero di cellule mitotiche}}{\text{Numero di cellule mitotiche}} \times 100$$

si raccomanda di avvalersi dell'**aumento relativo delle conte cellulari (RICC)** o del **raddoppiamento relativo della popolazione (RPD)**, poiché entrambi i metodi tengono conto della proporzione di popolazione cellulare che è andata incontro a divisione.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture trattate(finale-iniziale)})}{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture di controllo(finale-iniziale)})} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{Num.di raddoppiamenti della popolazione nelle colture trattate})}{(\text{Num.di raddoppiamenti della popolazione nelle colture trattate})} \times 100$$

dove:

Raddoppiamento della popolazione = [logaritmo (numero di cellule dopo il trattamento ÷ numero di cellule iniziale)] ÷ logaritmo 2

Ad esempio, un RICC o un RPD del 53 % indica una citotossicità/citostasi del 47 % e una citotossicità/citostasi del 55 % misurato con MI significa che il MI reale rappresenta il 45 % del controllo.

In ogni caso, occorre misurare il numero di cellule prima del trattamento, che deve essere identico per le colture trattate e per i controlli negativi.

L'RCC (ossia il rapporto fra il numero di cellule nelle colture trattate e il numero di cellule nelle colture di controllo) è stato usato come parametro di citotossicità in passato, ma oggi non è più raccomandato perché può sottovalutare la citotossicità.

Nelle colture di controllo negativo, il raddoppiamento della popolazione deve essere compatibile con l'esigenza di campionare le cellule dopo il trattamento, trascorso un lasso di tempo pari a circa 1,5 volte la durata del ciclo cellulare normale, e il coefficiente mitotico deve essere sufficientemente elevato per ottenere un numero adeguato di cellule in mitosi e calcolare attendibilmente una riduzione del 50 %.