

«B.11 Prova di aberrazione cromosomica del midollo osseo nei mammiferi

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alle linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 475 (2016), e fa parte di una serie di metodi di prova di 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 vivo di aberrazione cromosomica del midollo osseo nei mammiferi è particolarmente rilevante per valutare la genotossicità. Difatti, benché possano variare a seconda delle specie, i fattori del metabolismo in vivo, gli aspetti farmacocinetici e i processi di riparazione del DNA sono attivi e contribuiscono alle reazioni. La prova in vivo è inoltre utile per studiare più approfonditamente la genotossicità rilevata tramite un sistema in vitro.

La prova in vivo di aberrazione cromosomica del midollo osseo nei mammiferi è utilizzato per individuare aberrazioni cromosomiche strutturali indotte dalle sostanze chimiche in esame nelle cellule del midollo osseo di animali, di solito roditori (2) (3) (4) (5). Tali aberrazioni strutturali possono essere di due tipi: cromosomiche o cromatidiche. La maggior parte delle aberrazioni indotte da sostanze chimiche genotossiche è di tipo cromatidico, ma si verificano anche aberrazioni di tipo cromosomico. I danni cromosomici e i fenomeni ad esse connessi sono la causa di molte malattie genetiche umane e vi sono prove concrete del fatto che, quando causano alterazioni degli oncogeni e dei geni soppressori dei tumori, queste lesioni ed i fenomeni ad esse connessi sono implicati nella comparsa delle neoplasie umane e di quelle sperimentalmente indotte negli animali da laboratorio. Nelle prove di aberrazione cromosomica in vivo possono verificarsi casi di poliploidia (inclusa l'endoreduplicazione). Un aumento della poliploidia non è tuttavia, di per sé, un segno di potenziale aneugenico, e può semplicemente indicare una perturbazione del ciclo delle cellule o citotossicità. Questo test non è destinato a misurare l'aneuploidia, per il cui rilevamento sono raccomandati i test in vivo sui micronuclei negli eritrociti di mammifero (capitolo B.12 del presente allegato) o i test del micronucleo in vitro con cellule di mammifero (capitolo B.49 del presente allegato).

Le definizioni della terminologia usata figurano nell'Appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

Per tale saggio si usano di norma roditori, ma in certi casi si può ricorrere anche ad altre specie se ciò è giustificato sul piano scientifico. 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. L'utilizzazione di specie diverse dai ratti e dai topi deve essere scientificamente giustificata nella relazione. Se si ricorre a specie diverse dai roditori, viene raccomandato di integrare la misurazione delle aberrazioni cromosomiche del midollo osseo in un'altra prova di tossicità pertinente.

Se è comprovato che la sostanza o le sostanze chimiche in esame, o i loro metaboliti, non raggiungono il tessuto bersaglio, può non essere opportuno utilizzare questa prova.

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

Gli animali sono esposti alla sostanza chimica in esame attraverso un'adeguata via d'esposizione, e al momento opportuno, dopo il trattamento, sono soppressi in modo incruento. Prima della soppressione incruenta, gli animali sono trattati con un inibitore della metafase (ad es. colchicina o colcemid). Le preparazioni cromosomiche approntate dalle cellule di midollo osseo sono poi sottoposte a un processo di colorazione, e le cellule in metafase sono analizzate per individuare aberrazioni cromosomiche.

VERIFICA DELLA COMPETENZA DEL LABORATORIO

Prove di competenza

Per accertare che il laboratorio possieda un'esperienza sufficiente nella conduzione del saggio prima di utilizzarlo nelle prove di routine, il laboratorio deve dimostrare la capacità di riprodurre i risultati attesi dai dati pubblicati (ad es. (6)) riguardanti le frequenze delle aberrazioni cromosomiche, con un minimo di due sostanze per i controlli positivi (incluse le risposte deboli indotte da dosi basse di sostanze per i controlli positivi), come quelle elencate nella tabella 1, e con controlli sui mezzi disperdenti/solventi compatibili (cfr. il paragrafo 22). Le dosi utilizzate nel corso di tali sperimentazioni devono produrre aumenti riproducibili e collegati alle dosi somministrate, e devono dimostrare la sensibilità e l'intervallo dinamico del sistema di analisi sul tessuto in questione (il midollo osseo). Il metodo di conteggio deve essere quello che sarà usato dal laboratorio. Questo requisito non si applica ai laboratori con esperienza, che dispongono cioè di una base di dati storica quale definita ai paragrafi 10-14.

Dati di controllo storici

Nell'ambito delle prove di competenza il laboratorio deve stabilire:

- gamma e distribuzione dei controlli positivi storici, e
- gamma e distribuzione dei controlli negativi storici.

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 storici, i controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % di tale distribuzione. La banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio deve essere solida sotto il profilo statistico per garantire la capacità del laboratorio di valutare la distribuzione dei suoi dati di controllo negativi. La letteratura suggerisce che possa essere necessario un minimo di 10 esperimenti, ma che sarebbe preferibile contarne almeno 20, svolti in analoghe condizioni sperimentali. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali diagrammi di controllo (ad esempio carte C o carte X medio (7)), per rivelare la variabilità dei loro dati e dimostrare che la metodologia è "sotto controllo" nel laboratorio. 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 (8).

Se nell'ambito delle prove di competenza (descritte al paragrafo 9) il laboratorio non porta a termine un numero sufficiente di esperimenti per stabilire una distribuzione dei controlli negativi statisticamente solida (cfr. il paragrafo 11), si può accettare che la distribuzione sia definita durante i primi test di routine. Questo approccio deve seguire le raccomandazioni formulate nella letteratura (8), e i risultati dei controlli negativi ottenuti in questi esperimenti devono essere coerenti con i dati di controllo negativi pubblicati.

Eventuali modifiche apportate al protocollo sperimentale devono essere considerate in base alle loro ripercussioni sulla coerenza fra i nuovi dati e le esistenti banche dati di controlli storici del laboratorio. Solo le incongruenze significative dovrebbero portare alla creazione di una nuova banca dati di controlli storici, se il parere di un esperto stabilisce che vi è una differenza rispetto alla distribuzione precedente (cfr. il paragrafo 11). Durante la costituzione di questa nuova banca dati, il laboratorio non ha necessariamente bisogno di una banca dati completa di controlli negativi per permettere lo svolgimento di una prova, a condizione che esso possa dimostrare che i valori dei controlli negativi paralleli rimangono coerenti con la precedente banca dati o con i dati corrispondenti pubblicati.

I dati sui controlli negativi devono riguardare l'incidenza delle aberrazioni cromosomiche strutturali (senza "gap") in ogni animale. 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. 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 *outlier* estremi e sia provato che il sistema di prova è "sotto controllo" (cfr. il paragrafo 11) e che non si sono verificati errori tecnici o umani.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione delle specie animali

Di preferenza sono utilizzati individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. Sono comunemente usati i ratti, ma possono essere idonei anche i topi. Si può ricorrere a qualsiasi altra specie idonea di mammiferi, se ciò viene giustificato scientificamente nella relazione.

Condizioni di stabulazione e alimentazione degli animali

Per i roditori, la temperatura dello stabulario deve essere mantenuta a 22 °C (\pm 3 °C). Idealmente l'umidità relativa deve essere del 50-60 %. Deve comunque essere come minimo del 40 % e non deve preferibilmente superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata per questa via. Se non ci si aspetta alcun comportamento aggressivo, i roditori vanno alloggiati in piccoli gruppi (non più di cinque in ogni gabbia) dello stesso sesso e gruppo di trattamento, preferibilmente in gabbie a fondo pieno con adeguato arricchimento ambientale. Gli animali possono essere alloggiati individualmente solo se ciò è giustificato sotto il profilo scientifico.

Preparazione degli animali

Sono generalmente utilizzati animali adulti, giovani e sani (i roditori hanno idealmente un'età di 6-10 settimane all'inizio del trattamento, ma sono accettati anche animali di età un pò più avanzata), che vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. I singoli animali sono identificati univocamente applicando un metodo incruento e il meno possibile invasivo (cioè inanellamento, etichettatura, applicazione di un microchip o identificazione biometrica, evitando il taglio delle orecchie o la falangectomia) e devono essere acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Deve essere evitata ogni contaminazione incrociata fra il controllo positivo e la sostanza chimica in esame. 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.

Preparazione delle dosi

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

Solvente/mezzo disperdente

Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici ai livelli di dose usati 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. Fra gli esempi di solventi/mezzi disperdenti compatibili e comunemente usati si possono menzionare l'acqua, la soluzione fisiologica, la soluzione di metilcellulosa, la soluzione di carbossimetilcellulosa sodica, l'olio di oliva e l'olio di mais. In mancanza di dati di controllo storici o pubblicati che dimostrino che un solvente/mezzo disperdente atipico prescelto non induce aberrazioni strutturali o altri effetti nocivi, va effettuato uno studio iniziale per stabilire l'accettabilità del controllo del solvente/mezzo disperdente.

Controlli

Controlli positivi

Ogni prova deve generalmente includere un gruppo di animali trattati con una sostanza usata per i controlli positivi. Questa condizione può essere eliminata quando il laboratorio di prova ha dimostrato la sua competenza nello svolgimento della prova e ha stabilito l'intervallo dei controlli positivi storici. Quando manca un gruppo di controllo positivo parallelo, in ogni esperimento devono essere inclusi controlli del conteggio (vetrini fissati e non colorati). Questo può avvenire includendo nello studio campioni di riferimento idonei ottenuti e conservati in occasione di un esperimento separato di controllo positivo svolto periodicamente (ad es. ogni 6-18 mesi) nel laboratorio in cui è condotta la prova; ad esempio, durante la verifica della competenze e successivamente, se necessario, su base periodica.

Le sostanze chimiche per i controlli positivi devono portare, in modo affidabile, a un aumento individuabile della frequenza delle cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali al di là del livello spontaneo. Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente all'analista l'identità dei campioni codificati. È ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa da quella della sostanza chimica in esame, usando un programma di trattamento diverso, e che il campionamento avvenga in un unico momento. È anche ammissibile, se appropriato, l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata. Nella tabella 1 figurano esempi di sostanze chimiche per i controlli positivi.

Tabella 1.

Esempi di sostanze chimiche per i controlli positivi

Sostanza chimica	CASRN
Metansolfonato di etile	62-50-0
Metansolfonato di metile	66-27-3
Etilnitrosourea	759-73-9
Mitomicina C	50-07-7
Ciclofosfamide (monoidrato)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenmelammina	51-18-3

Controlli negativi

In ogni momento del campionamento devono essere inclusi animali del gruppo di controllo negativo, che sono gestiti nello stesso modo dei gruppi di trattamento, ma a cui non viene somministrata la sostanza chimica in esame. Se per la somministrazione della sostanza in esame si usa un solvente/mezzo disperdente, anche il gruppo di controllo deve riceverlo. Tuttavia, se dai dati dei controlli negativi storici risulta una variabilità intraspecifica e una frequenza delle cellule con aberrazioni strutturali coerente ad ogni momento del campionamento per il laboratorio di prova, può essere sufficiente un solo campionamento per il controllo negativo. In tal caso, esso deve avvenire al momento del primo campionamento effettuato nell'ambito dello studio.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

In generale, la risposta dei micronuclei è simile nei maschi e nelle femmine degli animali (9), ed è da prevedere che ciò valga anche per le aberrazioni cromosomiche strutturali; la maggior parte degli studi potrebbe pertanto venire effettuata sull'uno o sull'altro sesso. L'esistenza di dati che dimostrano differenze rilevanti fra i maschi e le femmine (ad es. differenze riguardanti la tossicità sistemica, il metabolismo, la biodisponibilità, la tossicità del midollo osseo, ecc., incluso ad es. un *range-finding test*) incoraggerebbero l'uso di entrambi i sessi. Nella fattispecie potrebbe essere appropriato effettuare uno studio su entrambi i sessi, ad es. come parte di uno studio di tossicità a dose ripetuta. Nel caso si effettuino prove su entrambi i sessi potrebbe essere adeguato ricorrere al metodo fattoriale. Nell'appendice 2 figurano precisazioni sulle modalità di analisi dei dati in base a tale metodo.

All'inizio dello studio, la dimensione stabilita del gruppo deve consentire di disporre, in ogni gruppo, di almeno 5 animali analizzabili dello stesso sesso, o di ogni sesso se sono usati entrambi. Se l'esposizione umana a sostanze chimiche è specifica per un sesso, ad esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, il test deve essere eseguito su animali di tale sesso. A titolo di orientamento sul numero massimo di animali tipicamente necessario, uno studio sul midollo osseo con due momenti di campionamento, con tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo negativo parallelo, più un gruppo di controllo positivo (ogni gruppo composto da cinque animali dello stesso sesso), richiederebbe 45 animali.

Livelli di dose

Se viene effettuato uno studio preliminare di *range-finding* poiché non sono già disponibili dati appropriati per orientare la scelta delle dosi, tale studio deve essere svolto nello stesso laboratorio, usando specie, ceppi, sesso e un regime di trattamento identici a quelli che saranno utilizzati nello studio principale (10). Lo studio preliminare serve a individuare la dose massima tollerata (MTD), definita come la dose più alta che sarà tollerata per la durata della prova senza che appaia una tossicità che limita lo studio (inducendo ad esempio un calo del peso corporeo o citotossicità del sistema emopoietico, ma che non provoca morte o segni di dolore, sofferenza o stress che rendano necessaria una soppressione incruenta (11)).

La dose massima può essere definita anche come la dose che produce qualche segno di tossicità nel midollo osseo.

Le sostanze chimiche che comportano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche o che inducono processi di detossificazione che possono portare a una diminuzione dell'esposizione dopo un trattamento a lungo termine possono essere considerate eccezioni rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso.

Per ottenere informazioni sulla relazione dose-risposta, uno studio completo deve includere un gruppo di controllo negativo e almeno tre livelli di dose, generalmente separati da un fattore 2, ma non più di 4. Se la sostanza chimica in esame non provoca alcuna tossicità nell'ambito di un test di *range-finding* o secondo quanto emerge dai dati esistenti, la dose massima per una singola somministrazione deve essere di 2 000 mg/kg di peso corporeo. Se la sostanza chimica in esame provoca invece tossicità, la MTD deve corrispondere alla dose più elevata somministrata, e i livelli di dose utilizzati devono essere compresi in un intervallo che va dalla tossicità massima a una tossicità modica o assente. Quando una tossicità del tessuto bersaglio (midollo osseo) è osservata a tutti i livelli di dose di prova, è consigliabile un ulteriore studio con dosi non tossiche. Gli studi volti a descrivere più pienamente le informazioni quantitative sulla relazione dose-risposta possono richiedere gruppi di trattamento supplementari. Per certi tipi di sostanze chimiche in esame (ad es. medicinali per uso umano) per le quali valgono specifici requisiti, i limiti possono variare.

Prova limite

Se gli esperimenti per determinare gli intervalli di dose o i dati disponibili relativi ai ceppi di animali affini indicano che un trattamento uguale o superiore alla dose limite (sotto descritta) non produce effetti tossici osservabili (comprese nessuna depressione della funzione del midollo osseo o altre manifestazioni di citotossicità del tessuto bersaglio), e se non si prevede genotossicità sulla base degli studi di genotossicità in vitro o dei dati relativi alle sostanze chimiche strutturalmente affini, uno studio completo con tre livelli di dose può non essere considerato necessario, purché sia stato dimostrato che la sostanza o le sostanze chimiche in esame raggiungono il tessuto bersaglio (midollo osseo). In tali casi può essere sufficiente un solo livello di dose, corrispondente alla dose limite. Per un periodo di somministrazione di >14 giorni, la dose limite è 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno. Per periodi di somministrazione di 14 giorni o meno, la dose limite è 2 000 mg/kg/ di peso corporeo al giorno.

Somministrazione delle dosi

Nella concezione di un saggio va considerata la via d'esposizione umana prevista. Pertanto possono essere scelti, se giustificati, vie di somministrazione quali l'alimentazione, l'acqua potabile, la via sottocutanea locale, la via endovenosa, la via orale (sonda gastrica), inalatoria, intratracheale, o l'impianto. In ogni caso, deve essere scelta la via che garantisce un'adeguata esposizione del o dei tessuti bersaglio. L'iniezione intraperitoneale non è generalmente raccomandata in quanto non si tratta di una via di esposizione umana prevista, e va utilizzata solo con una specifica giustificazione scientifica. Se la sostanza chimica in esame è miscelata nell'alimentazione o nell'acqua occorre fare attenzione, specialmente nei casi di dosaggio singolo, che il lasso di tempo fra l'assunzione del cibo e dell'acqua e il campionamento sia sufficiente per consentire l'individuazione degli effetti (cfr. i paragrafi 33-34). Il volume massimo di liquido somministrabile in un'unica volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio. Esso non deve generalmente essere superiore a 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a massimo 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori deve essere giustificato. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da garantire la somministrazione di un volume costante in relazione al peso corporeo per tutti i livelli di dose.

Programma di trattamento

Le sostanze chimiche in esame sono di norma somministrate in un'unica presa, ma possono essere somministrate anche in prese frazionate (due prese nello stesso giorno, a distanza di qualche ora al massimo) per agevolare la somministrazione di un grosso volume. In queste situazioni, o in caso di somministrazione della sostanza chimica in esame per inalazione, il momento del campionamento deve essere programmato in base al momento di somministrazione dell'ultima dose o della fine dell'esposizione.

Vi sono pochi dati disponibili sull'idoneità di un protocollo a dosi ripetute per questa prova. Tuttavia, qualora sia auspicabile integrare la prova in questione con un test di tossicità a dosi ripetute, occorre fare attenzione a evitare la perdita delle cellule mitotiche che presentano danni cromosomici, fenomeno che può verificarsi con le dosi tossiche. Una tale integrazione è accettabile quando la dose massima è superiore o pari alla dose limite (cfr. il paragrafo 29), e la dose limite è somministrata a un gruppo di trattamento per tutta la durata del trattamento. Il test del micronucleo (metodo di prova B.12) va considerato come il test in vivo prescritto per le aberrazioni cromosomiche quando è auspicata un'integrazione con altri studi.

I campioni di midollo osseo devono essere prelevati in due momenti diversi dopo i singoli trattamenti. Per i roditori, il primo intervallo di campionamento deve corrispondere al tempo necessario per completare una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale (che è generalmente di 12-18 ore dopo il periodo del trattamento). Poiché il tempo necessario affinché la sostanza o le sostanze chimiche in esame siano assorbite e metabolizzate e producano 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. Al momento del primo campionamento, tutti i gruppi di trattamento devono essere trattati e i campioni per l'analisi prelevati, mentre al momento del o dei campionamenti successivi deve essere somministrata solo la dose massima. Se il protocollo di trattamento è più lungo di un giorno in base a una giustificazione scientifica, si deve procedere ad un unico campionamento una volta trascorso un periodo equivalente fino a circa una volta e mezza la durata normale del ciclo cellulare dopo l'ultima somministrazione.

Dopo il trattamento e prima della raccolta dei campioni, agli animali viene iniettata per via intraperitoneale un'adeguata dose di un agente inibitore della metafase (ad es. colcemid o colchicina), e i campioni sono prelevati successivamente a un intervallo appropriato. Per i topi questo intervallo è di circa 3-5 ore prima della raccolta, e per i ratti è di 2-5 ore. Le cellule sono prelevate dal midollo osseo, sono ingrandite, fissate e colorate, e analizzate ai fini dell'individuazione di aberrazioni cromosomiche (12).

Osservazioni

Gli animali da laboratorio devono essere oggetto di osservazioni cliniche generali e i segni clinici devono essere registrati almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa o alle stesse ore e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Almeno due volte al giorno, durante il periodo di somministrazione, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio dello studio, almeno una volta alla settimana nel corso degli studi a dosi ripetute, e al momento della soppressione incruenta. Negli studi la cui durata è di almeno una settimana, la misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di eccessiva, ma non letale, tossicità vanno soppressi in modo incruento prima della fine del periodo di saggio (11).

Esposizione del tessuto bersaglio

Ove ciò sia giustificato e non esistano altri dati sull'esposizione (cfr. il paragrafo 44), al o ai momenti idonei va prelevato un campione di sangue per esaminare i livelli delle sostanze chimiche in esame nel plasma, allo scopo di dimostrare l'avvenuta esposizione del midollo osseo.

Midollo osseo e preparazioni cromosomiche

Immediatamente dopo la soppressione incruenta, dai femori e dalle tibie degli animali vengono prelevate le cellule del midollo osseo, che vengono esposte a una soluzione ipotonica e fissate. Le cellule in metafase vengono poi poste sui vetrini e colorate secondo metodi prestabiliti (cfr. (3) (12)).

Analisi

Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'analisi, e devono essere randomizzati in modo che l'analista non conosca le condizioni del trattamento.

Come misura della citotossicità deve essere determinato il coefficiente mitotico in almeno 1 000 cellule per animale, in tutti gli animali trattati (compresi i controlli positivi), e nei controlli negativi non trattati o con somministrazione della sostanza chimica in esame in solvente/mezzo disperdente.

Per individuare le aberrazioni cromosomiche strutturali, inclusi ed esclusi i gap, devono essere analizzate almeno 200 metafasi per ogni animale (6). Tuttavia, se la banca dati dei controlli negativi storici indica che la frequenza di fondo media delle aberrazioni cromosomiche strutturali nel laboratorio di prova è <1 %, occorre prendere in considerazione l'opportunità di esaminare cellule supplementari. Le aberrazioni di tipo cromatidico e cromosomico devono essere registrate separatamente e classificate in sottotipi (rotture, scambi). Le procedure in uso nel laboratorio devono garantire che l'analisi delle aberrazioni cromosomiche sia effettuata da analisti qualificati e, se appropriato, che sia oggetto di una revisione inter pares. Poiché le procedure di preparazione dei vetrini causano spesso la rottura di una parte delle cellule in metafase, con perdita di cromosomi, le cellule conteggiate devono quindi contenere un numero di centromeri non inferiore a $2n \pm 2$, dove n è il numero aploide di cromosomi per quella specie.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. Per ogni animale devono essere indicati l'indice mitotico, il numero di cellule in metafase conteggiate, il numero di aberrazioni per ogni cellula in metafase e la percentuale di cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali. Devono essere elencati i diversi tipi di aberrazioni cromosomiche strutturali, con il relativo numero e la frequenza per i gruppi trattati e i gruppi di controllo. I gap, così come le cellule poliploidi e le cellule con cromosomi endoriduplicati sono registrati separatamente. La frequenza dei gap viene indicata nella relazione, ma non viene generalmente inclusa nell'analisi della frequenza totale delle aberrazioni strutturali. Se non c'è un'evidente differenza di risposta tra i sessi, i dati possono essere combinati nell'analisi statistica. Nella relazione devono anche figurare i dati riguardanti la tossicità animale e i segni clinici.

Criteri di accettabilità

L'accettabilità delle prove si basa sui seguenti criteri:

- a) l'aggiunta dei dati sui controlli negativi paralleli alla banca dati di controlli storici del laboratorio è ritenuta accettabile (cfr. i paragrafi 11-14);
- b) i controlli positivi paralleli o i controlli ai fini del conteggio devono indurre risposte compatibili con quelle ottenute dalle banche dati dei controlli positivi storici e devono produrre un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo (cfr. i paragrafi 20-21);
- c) è stato analizzato il numero adeguato di dosi e cellule;
- d) i criteri per la scelta della dose massima sono coerenti con quelli descritti ai paragrafi 25-28.

Valutazione e interpretazione dei risultati

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se:

- a) almeno uno dei gruppi di trattamento manifesta un aumento statisticamente significativo della frequenza delle cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali (gap esclusi) rispetto al controllo negativo parallelo;
- b) una valutazione con un test di tendenza adeguato mostra che tale aumento è correlato alla dose almeno per uno dei momenti del campionamento, e
- c) uno o più risultati si situano al di fuori della distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson)

Se in un particolare momento del campionamento viene esaminata solo la dose massima, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se vi è un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo, e i risultati sono al di fuori della distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson). Raccomandazioni relative agli appropriati metodi statistici figurano nella letteratura (13). Quando si effettua un'analisi della relazione dose-risposta, devono essere analizzati almeno tre gruppi di trattamento. Nei test statistici l'unità sperimentale deve essere l'animale. L'ottenimento di risultati positivi nella prova di aberrazione cromosomica indica che la sostanza chimica in esame induce aberrazioni cromosomiche strutturali nel midollo osseo della specie esaminata.

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente negativa se in tutte le condizioni sperimentali esaminate:

- a) nessuno dei gruppi di trattamento manifesta un aumento statisticamente significativo della frequenza delle cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali (gap esclusi) rispetto al controllo negativo parallelo;

- b) una valutazione con un test di tendenza adeguato mostra che in nessuno dei momenti del campionamento vi è un aumento correlato alla dose,
- c) tutti i risultati si situano entro la distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), e
- d) l'esposizione del midollo osseo alla sostanza chimica in esame è effettivamente avvenuta.

Raccomandazioni relative ai metodi statistici più appropriati figurano nella letteratura (13). L'esposizione del midollo osseo alla sostanza chimica in esame può essere dimostrata, ad esempio, da un calo dell'indice mitotico, o dalla misurazione del livello delle sostanze in esame nel plasma o nel sangue. In caso di somministrazione per via endovenosa, la prova dell'esposizione non è necessaria. In alternativa, l'esposizione del midollo osseo può essere dimostrata ricorrendo ai dati ADME, ottenuti nell'ambito di uno studio indipendente usando la stessa via di somministrazione e le stesse specie. L'ottenimento di risultati negativi indica che, nelle condizioni di prova, la sostanza chimica in esame non induce aberrazioni cromosomiche strutturali nel midollo osseo delle specie esaminate.

Non è necessario verificare una risposta chiaramente positiva o chiaramente negativa.

Nei casi in cui la risposta non sia chiaramente negativa né chiaramente positiva, per poter stabilire la rilevanza biologica di un risultato (ad es. un aumento debole o marginale), i dati devono venire sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite sugli esperimenti portati a termine. In alcuni casi può essere utile analizzare più cellule o ripetere l'esperienza in condizioni sperimentali modificate.

In rari casi, anche dopo ulteriori indagini, i dati non permetteranno di concludere se la sostanza chimica in esame produce risultati positivi o negativi, e lo studio dovrà pertanto essere dichiarato ambiguo.

La frequenza delle metafasi poliploidi e delle metafasi con endoriduplicazione, rispetto al numero totale delle metafasi, va registrata separatamente. Un aumento del numero di cellule poliploidi/endoriduplicate può indicare che la sostanza chimica in esame è in grado di inibire il processo mitotico o il ciclo cellulare (cfr. il paragrafo 3).

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti:

Sintesi

Sostanza chimica in esame:

- origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;
- stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

Sostanza monocomponente:

- natura fisica, idrosolubilità, e altre proprietà fisico-chimiche rilevanti;
- identificazione chimica: nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula di struttura, purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e realizzabile in pratica, ecc.

Sostanza multicomponente, sostanze UVCB e miscele:

- caratterizzate, nella misura del possibile, tramite l'identità chimica (cfr. supra), le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche rilevanti dei componenti.

Preparazione della sostanza chimica in esame:

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

Animali da laboratorio:

- specie/ceppi usati e giustificazione dell'utilizzo;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;
- metodo di identificazione univoca degli animali;
- per gli studi a breve termine: peso dei singoli animali all'inizio e alla fine del saggio; per gli studi di durata superiore a una settimana: peso individuale durante lo studio e consumo di cibo. Devono essere inclusi l'intervallo, la media e la deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni di prova:

- controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);
- dati del test di *range-finding*, se effettuato;
- criteri di selezione delle dosi;
- dettagli della preparazione della sostanza chimica in esame;
- modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;
- criteri di scelta della via e della durata della somministrazione;
- metodi usati per verificare che la sostanza o le sostanze in esame siano entrate in circolo o abbiano raggiunto il midollo osseo;
- dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;
- dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;
- metodo di soppressione incruenta;
- metodo di analgesia (se usato);
- descrizione dettagliata dello schema di trattamento e di campionamento e giustificazione delle scelte;
- metodi di preparazione dei vetrini;
- metodi di misurazione della tossicità;
- natura del prodotto chimico inibitore della metafase, concentrazione, dosaggio e tempi di somministrazione prima del campionamento;
- procedure di isolamento e conservazione dei campioni;
- criteri di conteggio delle aberrazioni;

- numero di cellule in metafase esaminate per ogni animale e numero di cellule esaminate ai fini della determinazione dell'indice mitotico;
- criteri di accettabilità dello studio;
- criteri in base ai quali considerare lo studio positivo, negativo, o senza risultati.

Risultati:

- condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;
- indice mitotico, indicato separatamente per ciascun animale;
- tipo e numero di aberrazioni e di cellule aberranti, 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 di ploidia, comprese le frequenze delle cellule poliploidi e/o delle cellule endoriduplicate;
- relazione dose-risposta, ove possibile;
- analisi e metodo statistico applicati;
- dati comprovanti l'avvenuta esposizione del midollo osseo;
- dati dei controlli negativi e positivi paralleli con intervalli, medie e deviazioni standard;
- dati sui controlli negativi e positivi storici con intervalli, medie e deviazioni standard, e limiti del controllo al 95 % per la distribuzione, così come il periodo di tempo interessato e il numero di osservazioni;
- criteri stabiliti ai fini di una risposta positiva o negativa.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

Riferimenti.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), "Cytogenetic Tests in Mammals", in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.
- (4) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 417/1, pp. 19-30.
 - (7) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
 - (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
 - (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.
 - (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.
 - (11) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N° 19, OECD Publishing, Paris.
 - (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1044, pp. 147-163.
 - (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), "Statistical Analysis of in vivo Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dai multipli delle intere serie di cromosomi (*cf.* poliploidia).

Centromero: 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.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

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.

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.

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

Indice mitotico: rapporto fra il numero di cellule in mitosi e il numero totale di cellule in una popolazione, che indica lo stato di proliferazione di tale popolazione di cellule.

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

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.

Aberrazione cromosomica 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.

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

Appendice 2

METODO FATTORIALE PER INDIVIDUARE LE DIFFERENZE FRA I SESSI NEL SAGGIO IN VIVO SULLE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE**Metodo fattoriale e analisi**

Questo modello prevede di esporre 5 maschi e 5 femmine a ciascuna concentrazione sperimentale e comporta pertanto l'utilizzo di un minimo di 40 animali (20 maschi e 20 femmine più i relativi controlli positivi).

Il modello qui presentato — una delle forme semplici del modello fattoriale — è equivalente a un'analisi della varianza a due fattori, in cui il sesso e il livello delle concentrazioni costituiscono i fattori principali. I dati possono essere analizzati utilizzando diversi programmi statistici standard, quali SPSS, SAS, STATA, Genstat o il programma R.

A partire dall'insieme dei dati si determina la variabilità tra i sessi e le concentrazioni, nonché la variabilità relativa alle interazioni tra sessi e concentrazioni. Ciascuno di questi aspetti è quindi valutato in rapporto alla stima della variabilità tra gli animali ripartiti nei gruppi di animali dello stesso sesso esposti alle stesse concentrazioni. Maggiori informazioni su questa metodologia sono reperibili in diversi manuali standard di statistica (cfr. bibliografia), nonché nelle schede "di aiuto" fornite con i programmi statistici.

In seguito viene esaminata l'interazione sesso x concentrazione in una tabella ANOVA ⁽¹⁾. In assenza di un termine di interazione significativo la combinazione dei valori inter-sessi o inter-livelli di concentrazione consente di effettuare test statistici validi tra i livelli, basandosi sul termine di variabilità intra-gruppo combinata di ANOVA.

L'analisi prosegue suddividendo la variabilità stimata tra le concentrazioni in modo da ottenere contrasti che permettano di stabilire contrasti lineari e quadratici delle risposte per l'insieme dei livelli di concentrazione. Quando si riscontra un'interazione significativa sesso x concentrazione, questo termine può essere a sua volta in ripartito in contrasti di interazione lineare x sesso e quadratica x sesso. In questo modo si può verificare se le risposte alle concentrazioni sono parallele per i due sessi o se vi è una differenza riconducibile al sesso.

La stima della variabilità intra-gruppo combinata può essere utilizzata per verificare lo scarto tra le medie, confrontandole due a due. I confronti possono essere effettuati tra le medie per i due sessi e tra le medie dei diversi livelli delle concentrazioni (come, ad esempio, confronti tra i livelli dei controlli negativi). Nei casi in cui si registra un'interazione significativa i confronti possono essere effettuati tra le medie di concentrazioni diverse per lo stesso sesso o tra le medie dei due sessi a parità di concentrazione.

Riferimenti

Numerosi manuali di statistica esaminano la teoria, la concezione, la metodologia, l'analisi e l'interpretazione dei modelli fattoriali, dall'analisi più semplice, a due fattori, alle forme più complesse utilizzate per la metodologia *Design of Experiment*. Di seguito ne è riportato un elenco non completo. Alcuni manuali forniscono esempi di modelli comparabili e, in alcuni casi, forniscono un codice che permette di effettuare l'analisi utilizzando diversi programmi.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Gli statistici che applicano una metodologia di modellizzazione quale l'utilizzo dei modelli lineari generalizzati (GLM) possono effettuare l'analisi in modo diverso ma comparabile, senza tuttavia ricavare necessariamente la tradizionale tabella ANOVA che risale a concetti algoritmici del calcolo statistico elaborati in epoca preinformatica.

Montgomery D.C. (1997). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons Inc.»