

## INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alle linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 474 (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 sui micronuclei dei 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 sui micronuclei dei mammiferi è utilizzato per individuare i danni indotti dalla sostanza chimica in esame sui cromosomi o sull'apparato mitotico degli eritoblasti. Esso valuta la formazione di micronuclei in eritrociti provenienti dal midollo osseo o dalle cellule del sangue periferico di animali, di norma roditori.

Lo scopo della prova sui micronuclei è individuare le sostanze chimiche che provocano danni citogenetici, che si manifestano nella formazione di micronuclei contenenti frammenti residui di cromosomi o cromosomi interi.

Quando da un eritroblasto del midollo osseo si sviluppa un eritrocita immaturo (designato a volte anche come eritrocita policromatico o reticolocito), il nucleo principale viene espulso; i micronuclei formati possono rimanere nel citoplasma. In queste cellule la visualizzazione o il rilevamento dei micronuclei sono facilitati poiché manca il nucleo principale. L'aumento della frequenza di eritrociti immaturi contenenti micronuclei negli animali trattati è un'indicazione di aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche indotte.

Gli eritrociti contenenti micronuclei di nuova formazione sono individuati e quantificati mediante colorazione, seguita o da un conteggio visivo al microscopio, o da un'analisi automatizzata. Il conteggio di un numero sufficiente di eritrociti immaturi nel sangue periferico o nel midollo osseo degli animali adulti è grandemente facilitato dall'uso di una piattaforma di calcolo automatizzata. Tali piattaforme sono alternative accettabili alla valutazione manuale (2). Studi comparativi hanno mostrato che tali metodi, usando standard di calibrazione adeguati, possono consentire riproducibilità inter- e intra-laboratorio e sensibilità migliore di quella consentita dal conteggio manuale al microscopio (3) (4). I sistemi automatizzati che possono misurare la frequenza degli eritrociti contenenti micronuclei includono (ma non sono limitati a questi): citometri a flusso (5), piattaforme di analisi delle immagini (6) (7), e citometri a scansione laser (8).

Benché generalmente non rientri nella prova, i frammenti di cromosomi possono essere distinti dai cromosomi interi in base a una serie di criteri. Questi includono la presenza o l'assenza del cinetocore, o del centromero, entrambi caratteristici dei cromosomi intatti. L'assenza del cinetocore, o del centromero, indica che il micronucleo contiene solo frammenti di cromosomi, mentre la presenza è indicativa di una perdita cromosomica.

Le definizioni della terminologia usata figurano nell'Appendice 1.

## CONSIDERAZIONI INIZIALI

In questo saggio il tessuto bersaglio delle lesioni genetiche è il midollo osseo di roditori adulti giovani. In questo tessuto sono difatti prodotti gli eritrociti. La misurazione dei micronuclei negli eritrociti immaturi del sangue periferico può essere effettuata in altre specie di mammiferi per i quali è stata dimostrata una sensibilità sufficiente per l'individuazione di sostanze chimiche che provocano aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche in queste cellule (tramite induzione di micronuclei negli eritrociti immaturi), e a condizione che ciò sia giustificato sul piano scientifico. L'endpoint è la frequenza degli eritrociti immaturi micronucleati. La frequenza degli eritrociti maturi contenenti micronuclei nel sangue periferico può anch'essa essere utilizzata come endpoint nelle specie che non presentano una forte selezione splenica contro le cellule contenenti micronuclei e quando gli animali sono trattati continuamente per un periodo superiore alla durata di vita di un eritrocita nella specie utilizzata (ad es., nel topo, 4 settimane o più).

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. Se si utilizza il midollo osseo, al momento / ai momenti opportuni, dopo il trattamento, gli animali sono soppressi in modo incruento. Il midollo osseo viene estratto, e si procede alle preparazioni e alle colorazioni (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Quando si utilizza il sangue periferico, il sangue viene raccolto al momento / ai momenti opportuni dopo il trattamento e si procede alle preparazioni e alle colorazioni (12) (16) (17) (18). In caso di somministrazione acuta del trattamento, è importante effettuare il prelievo del midollo osseo o del sangue in un momento in cui l'induzione di eritrociti immaturi micronucleati dovuta al trattamento possa essere individuata. In caso di prelievo di sangue periferico, perché tali elementi appaiano nella circolazione sanguigna deve essere trascorso un lasso di tempo sufficiente. Le preparazioni sono analizzate ai fini dell'individuazione dei micronuclei, tramite visualizzazione con microscopio, analisi delle immagini, citometri a flusso, oppure citometria a scansione laser.

## 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 (17) (19) (20) (21) (22) riguardanti le frequenze dei micronuclei, 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 su mezzi disperdenti/solventi compatibili (cfr. il paragrafo 26). 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 o il sangue periferico). 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 14-18.

### **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 (23)), 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 (24).

Se nell'ambito delle prove di competenza (descritte al paragrafo 13) il laboratorio non porta a termine un numero sufficiente di esperimenti per stabilire una distribuzione dei controlli negativi statisticamente solida (cfr. il paragrafo 15), si può accettare che la distribuzione sia definita durante i primi test di routine. Questo approccio deve seguire le raccomandazioni formulate nella letteratura (24), 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 15). 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 rimangano coerenti con la precedente banca dati o con i dati corrispondenti pubblicati.

I dati sui controlli negativi devono riguardare l'incidenza degli eritrociti immaturi micronucleati 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 15) e che non si sono verificati errori tecnici o umani.

## DESCRIZIONE DEL METODO

### **Preparazione**

#### *Selezione delle specie animali*

Di preferenza sono utilizzati individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. Si può ricorrere a topi, ratti, o ad altre specie idonee di mammiferi. Quando si utilizza il sangue periferico, occorre accertare che la rimozione splenica delle cellule micronucleate dalla circolazione non comprometta l'individuazione dei micronuclei indotti nelle specie selezionate. Questo è stato chiaramente dimostrato per il sangue periferico del topo e del ratto (2). 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 dei micronuclei indotti dalle aberrazioni cromosomiche del midollo osseo in un'altra prova di tossicità pertinente.

### *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.

## **Condizioni sperimentali**

### *Solvente/mezzo disperdente*

Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici ai livelli di dose usati e non deve poter 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 micronuclei 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 o campioni di sospensione cellulare, se appropriato ai fini del metodo di conteggio). 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); 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 dei micronuclei al di là del livello spontaneo. Quando si ricorre al conteggio manuale al microscopio, 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.

Sostanze chimiche e CASRN
Metansolfonato di etile [CASRN 62-50-0]
Metansolfonato di metile [CASRN 66-27-3]
Etilnitrosoarea [CASRN 759-73-9]
Mitomicina C [CASRN 50-07-7]
Ciclofosfamide (monoidrato) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Trietilenmelamina [CASRN 51-18-3]
Colchicina [CASRN 64-86-8] o vinblastina [CASRN 865-21-4] — come aneugeni

### Controlli negativi

In ogni fase 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 da dati dei controlli negativi storici risulta una variabilità intraspecifica e una frequenza delle cellule con micronuclei coerente ad ogni fase 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.

Se viene usato sangue periferico, un campione prelevato prima del trattamento può essere accettato al posto del controllo negativo parallelo per gli studi di breve durata, qualora i dati ottenuti siano coerenti con la banca dei dati di controllo storici del laboratorio di prova. Per i ratti è stato dimostrato che il campionamento pre-trattamento di piccoli volumi (ad es. < 100 µl/al giorno) ha un impatto minimo sulla frequenza di fondo dei micronuclei (25).

## PROCEDURA

### Numero e sesso degli animali

In generale, la risposta dei micronuclei è simile nei maschi e nelle femmine degli animali, e, pertanto, la maggior parte degli studi potrebbe pertanto venire effettuata sull'uno o sull'altro sesso (26). 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. in un *range-finding test*) incoragerebbero 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 effettuato conformemente ai parametri stabiliti al paragrafo 37, con tre gruppi di trattamento e controlli negativi e positivi paralleli (ogni gruppo composto da cinque animali dello stesso sesso), richiederebbe fra i 25 e i 35 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 (27). 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 senza provocare morte o segni di dolore, sofferenza o stress che rendano necessaria una soppressione incruenta (28)).

La dose massima può essere definita anche come la dose che produce tossicità nel midollo osseo (ad es. una diminuzione della proporzione di eritrociti immaturi rispetto al numero totale di eritrociti nel midollo osseo o nel sangue periferico di più del 50 %, ma senza che questa proporzione si riduca a meno del 20 % del valore di controllo). Tuttavia, dall'analisi delle cellule con reazione positiva al CD71 nella circolazione sanguigna periferica (con citometria a flusso), emerge che questa frazione di eritrociti immaturi molto giovani risponde alle sostanze tossiche più rapidamente della più ampia schiera di eritrociti immaturi positivi all'RNA. Pertanto, può apparire una tossicità apparente maggiore in caso di sperimentazioni che prevedono un'esposizione acuta seguita dall'esame della frazione di eritrociti immaturi positivi al CD71 rispetto alle metodologie che individuano gli eritrociti immaturi sulla base del contenuto di RNA. Per questa ragione, quando l'esperimento prevede cinque o meno giorni di trattamento, il livello di dose più elevato, e tossico, della sostanza chimica in esame può essere definito come la dose che provoca una riduzione statisticamente significativa della proporzione degli eritrociti immaturi positivi al CD71 rispetto al numero totale di eritrociti, senza che questa proporzione scenda al di sotto del 5 % del valore di controllo (29).

Le sostanze chimiche che comportano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche o che inducono processi di detossificazione che possono portare a una diminuzione dell'esposizione dopo una somministrazione 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 periodo di somministrazione di 14 giorni o più deve essere di 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno o, per periodi di somministrazione di meno di 14 giorni, di 2 000 mg/kg di peso corporeo al giorno. 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. Quando la somministrazione avviene per 14 giorni o più, la dose limite è 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno. Per periodi di somministrazione di meno di 14 giorni, 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. il paragrafo 37). 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

Sono di preferenza effettuati 2 o più trattamenti, somministrati a intervalli di 24 ore, specialmente quando la prova viene integrata in altri studi di tossicità. Alternativamente, possono essere somministrati trattamenti singoli, se ciò è giustificato sul piano scientifico (ad es. qualora sia noto che le sostanze chimiche in esame bloccano il ciclo cellulare). Le sostanze chimiche in esame possono anche essere somministrate in prese frazionate, cioè 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.

La prova può essere realizzata su topi o su ratti in uno dei tre seguenti modi:

- a. Gli animali sono trattati una volta con la sostanza chimica in esame. I campioni del midollo osseo sono prelevati almeno due volte (da gruppi di animali indipendenti), cominciando non prima di 24 ore dopo il trattamento ma senza andare oltre le 48 ore dopo il trattamento, con adeguati intervalli fra i campioni, a meno che la sostanza chimica non sia nota per avere un tempo di dimezzamento eccezionalmente lungo. Se il prelievo è effettuato meno di 24 ore dopo la somministrazione occorre fornirne la ragione. Sono prelevati almeno due volte anche i campioni di sangue periferico (dallo stesso gruppo di animali), ad adeguati intervalli, cominciando non prima di 36 ore dopo il trattamento ma senza andare al di là delle 72 ore. Al momento del primo campionamento, tutti i gruppi di trattamento devono essere trattati e devono essere raccolti i campioni per l'analisi, mentre al momento del o dei campionamenti successivi deve essere somministrata solo la dose massima. Quando si ottiene una risposta positiva ad un momento del campionamento, non sono necessari prelievi supplementari a meno che non siano necessarie informazioni quantitative sulla relazione dose-risposta. I tempi di raccolta descritti sono una conseguenza della cinetica di comparsa e scomparsa dei micronuclei in questi 2 compartimenti tissutali.
- b. Se si procede a 2 trattamenti giornalieri (per esempio due trattamenti a intervalli di 24 ore), i campioni vanno prelevati un'unica volta, fra le 18 e le 24 ore dopo l'ultimo trattamento per il midollo osseo e tra le 36 e le 48 ore dopo l'ultimo trattamento per il sangue periferico (30). I tempi di raccolta descritti sono una conseguenza della cinetica di comparsa e scomparsa dei micronuclei in questi 2 compartimenti tissutali.
- c. Se si procede a tre o più trattamenti giornalieri (per esempio tre o più trattamenti ad intervalli di circa 24 ore), i campioni di midollo osseo devono essere prelevati non più tardi di 24 ore dopo l'ultimo trattamento e il sangue periferico non più tardi di 40 ore dopo l'ultimo trattamento (31). Questa opzione di trattamento permette di combinare il test della cometa (per esempio, campionamento 2-6 ore dopo l'ultima somministrazione) con il test del micronucleo, e di integrare il test del micronucleo con gli studi di tossicità a dosi ripetute. Dai dati disponibili emerge che, in caso di 3 o più trattamenti, su questi periodi più ampi può essere osservata l'induzione di micronuclei (15).

Qualora ciò sia pertinente e scientificamente giustificato, e per facilitare l'integrazione con altri test di tossicità, possono essere utilizzati altri regimi di dosaggio o di campionamento.

## 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 della prova, almeno una volta alla settimana nel corso degli studi a dosi ripetute, e al momento della soppressione incruenta. Nelle prove 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 (28). In certe circostanze può essere controllata la temperatura corporea degli animali, poiché un'iper- o ipotermia indotta dal trattamento può falsare i risultati (32) (33) (34).

## Esposizione del tessuto bersaglio

Ove ciò sia giustificato e non esistano altri dati sull'esposizione (cfr. il paragrafo 48), 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).



## Preparazione del midollo osseo / del sangue

Le cellule del midollo osseo vengono di solito prelevate dal femore o dalla tibia degli animali immediatamente dopo la soppressione incruenta. Generalmente le cellule sono prelevate, preparate e colorate secondo metodi prestabiliti. Conformemente alle norme pertinenti sul benessere degli animali possono essere ottenute piccole quantità di sangue periferico usando un metodo che permetta la sopravvivenza della cavia (come il prelievo dalla vena caudale o da altro vaso sanguigno adeguato), oppure tramite puntura cardiaca o prelievo da un vaso sanguigno principale dopo la soppressione incruenta. Sia per gli eritrociti ottenuti dal midollo osseo che per quelli ottenuti dal sangue periferico, a seconda del metodo di analisi, le cellule possono venire immediatamente sottoposte a un processo di colorazione sopravvitala (16) (17) (18), vengono preparati strisci che sono poi colorati per l'analisi al microscopio, o fissati e opportunamente colorati per l'analisi citometrica a flusso. L'uso di un colorante specifico per il DNA [ad esempio, arancio di acridina (35) o Hoechst 33258 più pironina-Y (36)] può eliminare alcuni degli artefatti dovuti all'uso di un colorante non specifico per il DNA. Ciò non esclude l'uso di coloranti convenzionali (per esempio Giemsa per l'analisi microscopica). Si possono usare anche altri sistemi [per esempio colonne di cellulosa per la rimozione delle cellule nucleate (37) (38)], se ne è dimostrata la compatibilità con la preparazione dei campioni in laboratorio.

Qualora questi metodi siano applicabili, per individuare la natura dei micronuclei (cromosoma/frammento cromosomico) possono essere usati anticorpi anticinetocore (39), FISH con sonde di DNA pancentromerico (40), o marcatura in situ mediante primer specifici per DNA pancentromerico, unitamente a un'adeguata colorazione del DNA (41), per stabilire se il meccanismo di induzione di micronuclei è dovuto a un'attività clastogenica e/o aneugenica. Possono infine essere usati altri metodi per distinguere i clastogeni dagli aneugeni, purché sia stata dimostrata la loro efficacia.

### Analisi (manuale e automatizzata)

Tutti i vetrini o i campioni per l'analisi, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima di ogni tipo di analisi, e devono essere randomizzati in modo che l'analista manuale non conosca le condizioni del trattamento; questa codificazione non è necessaria quando si usano sistemi di conteggio automatizzato che non si basano sull'esame visivo e non possono essere influenzati dall'operatore. Per ogni animale, la percentuale di eritrociti immaturi rispetto agli eritrociti totali (immaturi + maturi) è determinata contando un totale di almeno 500 eritrociti per il midollo osseo e 2 000 eritrociti per il sangue periferico (42). Per determinare l'incidenza degli eritrociti immaturi micronucleati devono essere esaminati almeno 4 000 eritrociti immaturi per animale (43). Se la banca dati dei controlli negativi storici indica che la frequenza di fondo media degli eritrociti immaturi micronucleati nel laboratorio di prova è <0,1 %, occorre prendere in considerazione l'opportunità di esaminare cellule supplementari. Quando si analizzano i campioni, la percentuale di eritrociti immaturi rispetto al numero totale di eritrociti negli animali trattati non deve essere inferiore al 20 % della proporzione verificata nel gruppo di controllo mezzo disperdente/solvente con l'analisi microscopica, e non deve essere inferiore al 5 % circa della proporzione verificata nel gruppo di controllo mezzo disperdente/solvente con l'analisi citometrica e il conteggio degli eritrociti immaturi positivi al CD71+ (cfr. il paragrafo 31) (29). Ad esempio, per un saggio su midollo osseo con esame al microscopio, se la percentuale di controllo degli eritrociti immaturi nel midollo osseo è del 50 %, il limite superiore di tossicità equivarrebbe al 10 % di eritrociti immaturi.

Poiché la milza del ratto blocca e distrugge gli eritrociti micronucleati, per mantenere un'alta sensibilità delle analisi per l'esame del sangue periferico del ratto è preferibile limitare l'analisi degli eritrociti immaturi micronucleati alla frazione più giovane. Quando si utilizzano metodi di analisi automatizzata, questi eritrociti più immaturi possono essere individuati in base al loro contenuto elevato di RNA, o all'alto livello di recettori della transferrina (CD71+) espressi sulla loro superficie (31). Tuttavia, il raffronto diretto di vari metodi di colorazione ha mostrato che possono essere ottenuti risultati soddisfacenti con varie metodologie, compresa la colorazione classica con arancio di acridina (3) (4).

## DATI E RELAZIONE

**Trattamento dei risultati**

I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. Il numero degli eritrociti immaturi e degli eritrociti immaturi con micronuclei, nonché la percentuale degli eritrociti immaturi sul totale degli eritrociti, devono essere elencati separatamente per ciascun animale. Quando i topi sono trattati per 4 settimane o più, devono essere anche forniti, se raccolti, i dati sul numero e la percentuale degli eritrociti maturi micronucleati. 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 15-18);
- 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 parallelo (cfr. i paragrafi 24-25);
- 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 30-33.

**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 degli eritrociti immaturi micronucleati 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 (44) (45) (46) (47). Quando si effettua un'analisi della relazione dose-risposta, devono essere analizzati almeno tre gruppi di trattamento trattati. Nei test statistici l'unità sperimentale deve essere l'animale. L'ottenimento di risultati positivi nel test del micronucleo indica che la sostanza chimica in esame induce la formazione di micronuclei, che sono il risultato di danni cromosomici o danni all'apparato mitotico degli eritroblasti nelle specie in esame. Nel caso in cui sia stata effettuata una prova per individuare i centromeri nei micronuclei, una sostanza chimica in esame che produca micronuclei contenenti centromeri (DNA centromerico o cinetocore, indicativi di un'intera perdita cromosomica) è da considerarsi aneugenica.

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 degli eritrociti immaturi micronucleati 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 (44) (45) (46) (47). L'esposizione del midollo osseo alla sostanza chimica in esame può essere dimostrata, ad esempio, da un calo del rapporto fra eritrociti immaturi e maturi, 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 la formazione di micronuclei negli eritrociti immaturi delle specie utilizzate.

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.

### **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:*

- dati relativi ai 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 tessuto bersaglio;
- 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;
- procedure di isolamento e conservazione dei campioni;
- metodi di misurazione della tossicità;
- criteri di conteggio degli eritrociti immaturi micronucleati;
- numero di cellule esaminate per ogni animale per determinare la frequenza degli eritrociti immaturi micronucleati e la percentuale degli eritrociti immaturi rispetto agli eritrociti maturi;
- criteri di accettabilità dello studio;
- metodi (come l'uso di anticorpi anticinetocore o di sonde di DNA centromero- specifiche) per determinare se i micronuclei contengono cromosomi interi o frammenti, se del caso.

*Risultati:*

- condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;
- percentuale degli eritrociti maturi rispetto al totale degli eritrociti;
- numero degli eritrociti immaturi micronucleati, indicato separatamente per ciascun animale;
- media  $\pm$  deviazione standard degli eritrociti immaturi micronucleati per gruppo;
- relazione dose-risposta, ove possibile;
- analisi e metodi statistici applicati;
- 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 punti;
- dati comprovanti l'avvenuta esposizione del midollo osseo;
- dati di caratterizzazione indicanti se i micronuclei contengono cromosomi interi o frammenti, se del caso;
- 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) Hayashi, M. *et al.* (2007), in vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicology Sciences*, Vol. 94/1, pp. 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, *Toxicological Sciences*, Vol. 94/1, pp. 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, *Mutagenesis*, Vol. 26/1, pp. 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, *Mutation Research*, Vol. 370/1, pp. 65-73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

- (8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9-15.
- (11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61-118.
- (12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555-558.
- (14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513-522.
- (16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45-50.
- (21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419-424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

- (24) 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.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (27) 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.
- (28) 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, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/3, pp. 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, Vol. 10/4, pp. 313-319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 234-252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 413/1, pp. 7-14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicological Sciences*, Vol. 97/1, pp. 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 213/1, pp. 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, *Mutation Research*, Vol. 439/1, pp. 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo, *Mutagenesis*, Vol. 5/4, pp. 411-415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.

- 
- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99-104.
- (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97-99.
- (43) OECD (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.
- (44) 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.
- (45) 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.
- (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.
- (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, pp. 233-241.
-



*Appendice 1*

## DEFINIZIONI

**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:** sostanza o miscela.

**Eritroblasto:** stadio precoce dello sviluppo di un eritrocita, immediatamente precedente la formazione dell'eritrocita immaturo, quando la cellula contiene ancora il nucleo.

**Cinetocore:** struttura proteica che si forma sul centromero delle cellule eucariotiche, che collega il cromosoma ai polimeri microtubolari del fuso mitotico durante la mitosi e la meiosi, e che durante la divisione cellulare serve a separare i cromatidi fratelli.

**Micronuclei:** piccoli nuclei, distinti e soprannumerari rispetto al nucleo principale delle cellule, prodotti durante la telofase della mitosi (meiosi) da frammenti residui di cromosomi o da cromosomi interi.

**Eritrocita normocromatico o maturo:** un eritrocita completamente maturo che ha perso l'RNA residuo che rimane dopo l'enucleazione e/o ha perso altri marcatori cellulari a ciclo vitale breve che generalmente scompaiono a seguito dell'enucleazione, dopo la divisione finale dell'eritroblasto.

**Eritrocita policromatico o immaturo:** eritrocita di nuova formazione, a uno stadio di sviluppo intermedio, che reagisce alle componenti blu e rosse dei coloranti classici del sangue, come la colorazione di Wright-Giemsa, in virtù della presenza di RNA residuo nella cellula di nuova formazione. Queste cellule di nuova formazione sono praticamente quasi identiche ai reticolociti, visualizzabili usando una colorazione vitale che fa precipitare in un "reticolo" l'RNA residuo. Altri metodi, compresa la colorazione monocromatica dell'RNA con colorante fluorescente o l'evidenziazione dei marcatori di superficie a vita breve come il CD71 con anticorpi fluorescenti, sono ora spesso usati per individuare gli eritrociti di nuova formazione. Gli eritrociti policromatici, i reticolociti, e gli eritrociti positivi al marcatore CD71 sono tutti eritrociti immaturi, ciascuno corrispondente a uno stadio di sviluppo leggermente diverso.

**Reticolocito:** eritrocita di nuova formazione. L'RNA cellulare residuo precipita sotto forma di un caratteristico "reticolo", evidenziabile con un colorante vitale. Nei reticolociti e negli eritrociti policromatici l'età cellulare ha una distribuzione simile.

**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 DEL MICRONUCLEO****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 <sup>(1)</sup>. 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.

<sup>(1)</sup> 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.»