

B.62 Test della cometa *in vivo* in condizioni alcaline su cellule di mammiferi

INTRODUZIONE

Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 489 (2016). Il test della cometa *in vivo* in condizioni alcaline su cellule di mammiferi (elettroforesi su gel a singola cellula — *single cell gel electrophoresis*), nel prosieguo semplicemente il “test della cometa”, è utilizzato per individuare le rotture di filamenti del DNA in cellule o nuclei isolati a partire da tessuti multipli di animali, in genere roditori, esposti a materiali potenzialmente genotossici. Il test della cometa è stato esaminato e diversi gruppi di esperti hanno pubblicato raccomandazioni in materia (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Il presente metodo di prova è parte integrante di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. È stato elaborato un documento OCSE contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida (11).

Il test della cometa ha l'obiettivo di individuare le sostanze chimiche che provocano lesioni al DNA. In condizioni alcaline (> pH 13), il test della cometa può individuare rotture singole e doppie di filamenti provocate, ad esempio, da interazioni dirette con il DNA, siti alcali-labili o riconducibili a rotture provvisorie del DNA derivanti da una riparazione del DNA per escissione. Le rotture dei filamenti del DNA possono essere riparate, e avere quindi effetti non persistenti, possono essere letali per la cellula o possono essere riparate dando vita a una mutazione permanente funzionale. Possono inoltre provocare lesioni cromosomiche del tipo di quelle associate a molte malattie dell'uomo, quali il cancro.

Uno studio formale di validazione del test della cometa *in vitro* su roditori è stato effettuato nel periodo 2006-2012 con il coordinamento del Centro giapponese per la convalida dei metodi alternativi (JaCVAM) in collegamento con il Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (ECVAM), il Comitato di coordinamento inter-agenzia per la convalida dei metodi alternativi (ICCVAM) e il Centro inter-agenzia per la valutazione di metodi tossicologici alternativi del NTP (NICEATM) (12). Il presente metodo di prova indica l'uso e i limiti raccomandati del test della cometa e si basa sul protocollo finale (12) utilizzato nella prova di convalida e su pertinenti dati complementari pubblicati e non pubblicati (dati di proprietà dei laboratori).

Le definizioni dei termini fondamentali figurano nell'appendice 1. Va rilevato che per l'esecuzione del presente test possono essere utilizzate molte piattaforme diverse (vetrini per microscopio, gocce di gel, piastre a 96 pozzetti, ecc.). Per motivi di praticità in tutto il presente documento viene utilizzato il termine “vetrini” ma esso è riferito anche a tutti gli altri supporti.

CONSIDERAZIONI PRELIMINARI E LIMITI

Il test della cometa è un metodo per misurare le rotture di filamenti del DNA nelle cellule eucariote. Singole cellule/nuclei in una sospensione in gel di agarosio collocata sui vetrini sono sottoposte a lisi con un detergente e concentrazioni elevate di sale. La lisi permette di digerire le membrane cellulari e nucleari e consente il rilascio di anse di DNA a spirale, chiamate generalmente nucleotidi, e frammenti di DNA. L'elettroforesi a pH elevato produce strutture che assomigliano a comete e che, utilizzando adeguati coloranti fluorescenti, possono essere esaminate con un microscopio a fluorescenza; i frammenti di DNA migrano dalla testa verso la coda della cometa in base alla loro dimensione e l'intensità della coda della cometa in rapporto all'intensità totale (testa più coda) riflette la portata della rottura del DNA (13) (14) (15).

Il test della cometa *in vivo* in condizioni alcaline è particolarmente indicato per valutare il rischio genotossico, in quanto le risposte al test dipendono dall'ADME *in vivo* (assorbimento, distribuzione, metabolismo e eliminazione) e anche dai processi di riparazione del DNA. Questi ultimi possono variare a seconda delle specie, dei tessuti e dei tipi di lesioni del DNA.

Al fine di rispettare i requisiti in materia di benessere degli animali e, in particolare, la riduzione del loro impiego mediante la sostituzione, la riduzione e il perfezionamento degli esperimenti su animali (in inglese il principio delle tre R — *Replacement, Reduction, Refinement*), il presente test può essere integrato con altri studi tossicologici (10) (16) (17) oppure l'endpoint può essere combinato con altri endpoint della genotossicità, quali il test micronucleare di eritrocita di mammifero (18) (19) (20). Il test della cometa è generalmente praticato sui roditori, anche se è stato utilizzato con altre specie di mammiferi e non mammiferi. L'uso di specie diverse dai roditori deve essere giustificato caso per caso sul piano etico e scientifico e comunque si raccomanda vivamente di eseguire il test della cometa su specie diverse dai roditori soltanto nell'ambito di un altro studio sulla tossicità e non come test isolato.

La selezione della via di esposizione e del o dei tessuti da sottoporre a prova va determinata sulla base di tutte le conoscenze esistenti/disponibili delle sostanze chimiche in esame, ad esempio la via di esposizione umana intesa/ attesa, il metabolismo e la distribuzione, i potenziali effetti per il punto di contatto, le allerte strutturali, altri dati sulla tossicità o genotossicità e l'obiettivo dello studio. In questo modo, se del caso, il potenziale genotossico delle sostanze chimiche in esame può essere sottoposto a prova nel o nei tessuti interessati dagli effetti cancerogeni e/o da altri effetti tossici. Il test può essere considerato utile inoltre per esaminare ulteriormente la genotossicità rilevata da un sistema in vitro. È opportuno effettuare un test della cometa in vivo su un tessuto di interesse, se ci si può ragionevolmente attendere che tale tessuto sarà adeguatamente esposto.

I test di validazione più completi sull'uso del test della cometa hanno riguardato i tessuti somatici dei ratti maschi e sono stati effettuati in studi interlaboratorio, quali il test del JaCVAM (12) e in Rothfuss *et al.*, 2010 (10). Nello studio internazionale di convalida del JaCVAM sono stati utilizzati lo stomaco e il fegato. Il fegato, perché è l'organo maggiormente attivo nel metabolismo delle sostanze chimiche e perché è sovente bersaglio di cancerogenicità. Lo stomaco perché è di solito il primo punto di contatto delle sostanze chimiche dopo l'esposizione per via orale, per quanto anche altre aree del tratto gastrointestinale, quali il duodeno e il digiuno, vadano considerate tessuti di contatto e siano forse più pertinenti per l'uomo di quanto sia lo stomaco ghiandolare dei roditori. Ci si deve assicurare che tali tessuti non siano esposti a quantitativi eccessivamente elevati della sostanza chimica in esame (21). La tecnica di cui trattasi è in linea di principio applicabile a qualsiasi tessuto dal quale possano essere ricavate sospensioni analizzabili di singole cellule/nuclei. I dati in possesso di molti laboratori dimostrano che il test può essere applicato con successo a molti tessuti differenti e numerose pubblicazioni indicano l'applicabilità della tecnica a organi o tessuti diversi dal fegato e dallo stomaco, ad esempio l'intestino digiuno (22), i reni (23) (24), la pelle (25) (26), o le cellule provenienti dalla vescica (27) (28) e dal lavaggio polmonare o broncoalveolare (pertinente per lo studio delle sostanze chimiche inalate) (29) (30); sono stati realizzati inoltre test su organi multipli (31) (32).

Se, da un lato, può essere interessante per studiare gli effetti genotossici nelle cellule germinali, va tuttavia sottolineato, dall'altro, che il presente metodo di prova non è considerato appropriato per misurare le rotture dei filamenti del DNA in cellule germinali mature. Poiché, in materia di lesioni del DNA, la letteratura relativa all'uso del test della cometa per determinare la genotossicità sulle cellule germinali ha evidenziato livelli di fondo elevati e variabili (33), si ritiene necessario modificare il protocollo e migliorare gli studi di standardizzazione e convalida prima di includere nel metodo di prova il test della cometa sulle cellule germinali (ad esempio, quelle dello sperma). Inoltre, il regime di esposizione raccomandato, descritto nel presente metodo di prova, non è ottimale e, per un'applicazione all'analisi delle rotture del filamento di DNA nelle cellule mature dello sperma, sarebbero necessari tempi di esposizione o di campionamento più lunghi. Gli effetti genotossici misurati dal test della cometa nelle cellule dei testicoli a differenti stadi di differenziazione sono illustrati in letteratura (34) (35). Va tuttavia rilevato che le gonadi contengono un misto di cellule somatiche e germinali. Per questo motivo risultati positivi sull'insieme delle gonadi (testicoli) non indicano necessariamente danni alle cellule germinali; essi indicano tuttavia che la o le sostanze in esame e/o i loro metaboliti hanno raggiunto le gonadi.

Le condizioni sperimentali standard del test della cometa non permettono di individuare in modo affidabile i legami crociati. In alcune condizioni sperimentali potrebbero essere individuati i legami crociati DNA-DNA e DNA-proteina come pure altre modificazioni di base, quali le basi ossidate (23) (36) (37) (38) (39). Ma ulteriori ricerche sono necessarie per caratterizzare in modo adeguato le necessarie modifiche del protocollo. Pertanto, l'individuazione degli agenti responsabili dei legami crociati non è l'obiettivo principale del test qui descritto. Il test non è appropriato, neanche in versione modificata, per l'individuazione degli aneugeni.

Allo stato attuale delle conoscenze, il test della cometa in vivo presenta diversi altri limiti (cfr. appendice 3). Ci si aspetta che in futuro il metodo di prova sarà esaminato e, se necessario, modificato alla luce dell'esperienza acquisita.

Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tale verifica non è necessaria se la miscela viene sottoposta a prova in ottemperanza a un obbligo regolamentare.

PRINCIPIO DEL METODO

Gli animali sono esposti alla sostanza chimica in esame tramite una via adeguata. Ai punti 36-40 viene fornita una descrizione dettagliata di dosaggio e campionamento. Nei momenti scelti per il campionamento i tessuti di interesse sono sezionati e vengono preparate sospensioni di singole cellule/nuclei (se considerato utile, ad esempio per il fegato, può essere realizzata una perfusione *in situ*) in un gel di agarosio per fissarle sui vetrini. Le cellule/nuclei sono trattate con un tampone di lisi per rimuovere la membrana cellulare e/o nucleare e sono esposte a una base forte (ad esempio, $\text{pH} \geq 13$) per consentire lo svolgimento del DNA e il rilascio delle anse e frammenti di DNA "rilassato". Il DNA nucleare nell'agarosio è quindi sottoposto a elettroforesi. Le molecole normali, non frammentate, di DNA restano nella posizione in cui si trovava il DNA nucleare nell'agarosio, mentre il DNA frammentato e le anse di DNA rilassato si spostano verso l'anodo. Dopo l'elettroforesi il DNA è visualizzato utilizzando un adeguato colorante fluorescente. Le preparazioni sono analizzate utilizzando un microscopio e sistemi di analisi dell'immagine parzialmente o totalmente automatizzati. La portata della migrazione del DNA durante l'elettroforesi e la distanza di tale migrazione danno conto del numero e delle dimensioni dei frammenti di DNA. Il test della cometa presenta diversi endpoint. Per valutare le lesioni al DNA si raccomanda di prendere in considerazione il contenuto di DNA nella coda o l'intensità della coda (*% tail DNA or % tail intensity*) (12) (40) (41) (42). Dopo l'analisi di un sufficiente numero di nuclei, i dati sono interpretati utilizzando metodi di analisi appropriati.

Va sottolineato che le modifiche apportate a diversi aspetti della metodologia, inclusa la preparazione dei campioni, le condizioni dell'elettroforesi, i parametri dell'analisi visiva (ad esempio, intensità del colorante, intensità luminosa della lampada del microscopio e l'utilizzo di filtri del microscopio e i parametri dinamici della fotocamera), nonché le condizioni ambiente (ad esempio, illuminazione ambiente) sono state oggetto di indagine e potrebbero influenzare la migrazione del DNA (43) (44) (45) (46).

VERIFICA DELLA COMPETENZA DEL LABORATORIO

Ciascun laboratorio deve provare la propria competenza sperimentale a effettuare il test della cometa, dimostrando la capacità di ottenere sospensioni di singole cellule o nuclei in quantità sufficienti per tutti i tessuti in esame per ciascuna specie utilizzata. La qualità delle preparazioni viene analizzata innanzitutto sulla base della percentuale di DNA nella coda per gli animali trattati con il mezzo disperdente che si collocano in una gamma bassa riproducibile. I dati attuali suggeriscono che la percentuale media di DNA di coda del gruppo (basata sulla media delle mediane — cfr. punto 57 per dettagli su questi termini) nel fegato dei ratti non dovrebbe, di preferenza, superare il 6 %, dato che sarebbe conforme ai valori dello studio di convalida del JaCVAM (12) e di altri dati pubblicati o privati. Al momento non si dispone di dati sufficienti per formulare raccomandazioni relativamente alle gamme ottimali o accettabili per altri tessuti. Ciò non preclude tuttavia l'uso di altri tessuti, se giustificato. La relazione sulla prova deve illustrare in modo appropriato l'esecuzione del test della cometa su tali tessuti in relazione alla letteratura pubblicata o a dati privati. In primo luogo, una percentuale bassa di DNA di coda nei controlli è auspicabile per disporre di un intervallo dinamico sufficiente al fine di individuare un effetto positivo. In secondo luogo, ciascun laboratorio deve essere in grado di riprodurre le risposte attese per i mutageni diretti e promutageni, con differenti modalità di azione, come indicato nella tabella 1 (punto 29).

Sostanze positive possono essere selezionate, ad esempio, dallo studio di convalida del JaCVAM (12) o da altri dati pubblicati (cfr. punto 9), se del caso, giustificando tale scelta e dimostrando l'esistenza di risposte positive chiare nei tessuti di interesse. Deve essere inoltre dimostrata la capacità di individuare gli effetti deboli di mutageni conosciuti, quali l'EMS a basso dosaggio, stabilendo, a titolo di esempio, relazioni dose-risposta con adeguati numeri di dosi e intervalli tra le dosi. In un primo tempo le operazioni devono cercare di stabilire competenze nel trattamento dei tessuti di uso più comune, ad esempio il fegato dei roditori, per i quali è possibile operare confronti con i dati esistenti e i risultati attesi (12). Allo stesso tempo possono essere raccolti dati relativi ad altri tessuti, ad esempio stomaco/duodeno/digiuno, sangue ecc. Il laboratorio deve evidenziare la propria competenza per ciascun tessuto di ciascuna specie che prevede di studiare e dimostrare che in tale tessuto può essere ottenuta una risposta positiva accettabile con un mutageno conosciuto (ad esempio, EMS).

È necessario raccogliere i dati relativi al mezzo disperdente/controllo negativo per dimostrare la riproducibilità delle risposte negative e accertarsi che gli aspetti tecnici del test siano stati adeguatamente verificati o per suggerire la necessità di ristabilire gli intervalli di controllo storici (cfr. punto 22).

Va sottolineato che, se da un lato è possibile raccogliere tessuti multipli in fase di necropsia e trattarli per il test della cometa, il laboratorio, dall'altro, deve essere in grado di raccogliere differenti tessuti da un singolo animale, assicurandosi così che non vada trascurata nessuna lesione potenziale del DNA e che il test della cometa non sia compromesso. L'intervallo di tempo tra la soppressione dell'animale e la rimozione dei tessuti può essere critico (cfr. punto 44).

Nel mettere a punto le competenze nei diversi aspetti del test in questione si deve tenere conto del benessere degli animali; a tal fine è quindi possibile utilizzare tessuti provenienti da animali utilizzati in altri test. Inoltre, può non essere necessario effettuare uno studio completo nelle fasi di definizione di un nuovo metodo di prova in laboratorio e al fine di sviluppare le necessarie abilità si possono utilizzare meno animali e concentrazioni di prova.

Dati storici di controllo

In sede di verifica delle competenze il laboratorio deve creare una banca di dati storici per stabilire gli intervalli e le distribuzioni dei controlli positivi e negativi per i tessuti e le specie oggetto di indagine. In letteratura (47) figurano raccomandazioni sulle modalità di raccolta e uso dei dati storici (ad esempio, i criteri di inclusione o esclusione di dati nei dati storici e i criteri di accettabilità di un dato sperimentale). Differenti tessuti e differenti specie, come pure differenti mezzi disperdenti e vie di somministrazione, possono determinare percentuali di DNA di coda differenti per i controlli negativi. È pertanto importante stabilire intervalli dei controlli negativi per ciascun tessuto e specie. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali carte di controllo (ad esempio, carte C o X medio (48)) per evidenziare la variabilità dei loro dati e dimostrare che la metodologia è "sotto controllo". Può essere inoltre necessario ottimizzare la selezione delle sostanze appropriate per i controlli positivi, gli intervalli delle dosi e le condizioni sperimentali (ad esempio, le condizioni dell'elettroforesi) per individuare gli effetti deboli (cfr. punto 17).

Eventuali modifiche del protocollo sperimentale devono essere valutate in base alla coerenza con le banche dati storiche in relazione ai controlli. Eventuali notevoli incoerenze devono tradursi nella creazione di una nuova banca dati storica sui controlli.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione delle specie animali

Gli animali utilizzati sono di norma adulti giovani e sani (di età compresa tra 6 e 10 settimane all'inizio del trattamento, benché siano accettabili anche animali di età leggermente superiore) appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. La scelta delle specie di roditori deve basarsi i) sulle specie utilizzate in altri studi di tossicità (per poter effettuare la correlazione tra i dati e consentire l'integrazione degli studi), ii) sulle specie che hanno sviluppato tumori in uno studio sulla cancerogenicità (quando si studia il meccanismo della cancerogenesi) oppure iii) sulle specie che presentano il metabolismo più simile a quello dell'uomo, se note. Per il presente test si usano di norma roditori. Possono essere tuttavia utilizzate altre specie, qualora ciò sia eticamente e scientificamente giustificato.

Condizioni di stabulazione e alimentazione degli animali

Per i roditori la temperatura dello stabulario deve essere idealmente di 22 °C (\pm 3 °C). L'umidità relativa deve essere idealmente del 50-60 %, non inferiore al 30 % e, preferibilmente, non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata con questo metodo. I roditori vanno stabulati in piccoli gruppi (di solito non più di cinque) dello stesso sesso se non si prevede alcun comportamento aggressivo. Gli animali possono essere stabulati individualmente soltanto se ciò è giustificato dal punto di vista scientifico. Laddove possibile, il fondo delle gabbie deve essere compatto in quanto fondi grigliati possono provocare ferite gravi (49). È necessario fornire un adeguato arricchimento ambientale.

Preparazione degli animali

L'assegnazione degli animali ai gruppi di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. Gli animali sono identificati individualmente e acclimatati alle condizioni del laboratorio per almeno cinque giorni prima dell'inizio del trattamento. Per identificare individualmente gli animali deve essere usato il metodo meno invasivo possibile. Tra i metodi appropriati figurano l'apposizione di anelli, di etichette, di microchip e l'identificazione biometrica. L'apposizione di graffette metalliche sulle orecchie o sulle zampe non è scientificamente giustificata in queste prove. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali devono essere minime e non superare $\pm 20\%$.

Preparazione delle dosi

Le sostanze solide in esame vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati 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 (50) (51).

Le preparazioni della sostanza chimica in esame devono essere predisposte sul momento a meno di non disporre di dati che dimostrino la stabilità delle preparazioni in condizioni di stoccaggio e permettano di definire tali condizioni in modo adeguato.

Condizioni di prova

Mezzo disperdente

Il mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non deve reagire chimicamente con le sostanze chimiche in esame. L'uso di mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità per quanto riguarda gli animali utilizzati nella prova, la via di somministrazione e l'endpoint. Se possibile si raccomanda di considerare in primo luogo l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Si deve tenere presente che alcuni mezzi disperdenti (in particolare quelli viscosi) possono provocare infiammazioni e aumentare il livello di danno delle rotture di filamenti di DNA nel punto di contatto, soprattutto in caso di somministrazioni multiple.

Controlli

Controlli positivi

Attualmente, per ciascuna prova viene di norma utilizzato un gruppo comprendente un minimo di 3 animali analizzabili dello stesso sesso, o dei due sessi se sono utilizzati entrambi (cfr. punto 32), trattato con una sostanza utilizzata come controllo positivo. In futuro i laboratori potranno forse dimostrare che competenze tali da consentire loro di ridurre il numero dei controlli positivi. Qualora siano usati tempi di campionamento multipli (ad esempio, nel caso di un protocollo che prevede un'unica somministrazione), è sufficiente prevedere controlli positivi solo per un campionamento, garantendo al contempo una ripartizione equilibrata (cfr. punto 48). Non è necessario somministrare le sostanze chimiche utilizzate come controllo positivo per la stessa via della sostanza chimica in esame; è importante invece utilizzare la stessa via di somministrazione per misurare gli effetti sul punto di contatto. È necessario dimostrare che le sostanze utilizzate come controllo positivo provocano rotture dei filamenti di DNA in tutti i tessuti di interesse per la sostanza chimica in esame; l'EMS costituisce probabilmente la scelta più logica di controllo positivo in quanto ha prodotto rotture dei filamenti di DNA in tutti i tessuti oggetto di studio. Le dosi delle sostanze chimiche utilizzate come controllo positivo devono essere scelte in modo da produrre effetti moderati che consentano una valutazione dell'efficacia e della sensibilità della prova e possono basarsi sulle curve dose-risposta stabilite dal laboratorio nella fase di dimostrazione delle proprie competenze. La percentuale di DNA di coda nei controlli positivi simultanei deve essere coerente con gli intervalli prestabiliti in laboratorio per ciascun tessuto e tempi di campionamento per la specie considerata (cfr. punto 16). Esempi di sostanze usate per i controlli positivi e di alcuni loro tessuti bersaglio (nei roditori) figurano nella tabella 1. Sostanze diverse da quelle riportate nella tabella 1 possono essere selezionate, se ciò è scientificamente giustificato.

Tabella 1

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

Sostanze e n. CAS
Metansolfonato di etile (n. CAS 62-50-0), per tutti i tessuti
Etilnitrosoarea (n. CAS 759-73-9), per il fegato e lo stomaco, il duodeno o il digiuno
Metansolfonato di metile (n. CAS 66-27-3), per il fegato, lo stomaco, il duodeno o il digiuno, le cellule provenienti dal lavaggio polmonare o broncoalveolare, reni, vescica, polmoni, testicoli e midollo osseo/sangue
N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (n. CAS: 70-25-7), per lo stomaco, il duodeno o il digiuno
1,2-dimetilidrazina 2HCl (n. CAS 306-37-6), per il fegato e l'intestino
N-metil-N-nitrosoarea (n. CAS 684-93-5), per il fegato, il midollo osseo, sangue, reni, stomaco, digiuno e cervello

Controlli negativi

In ciascuna prova e per ciascun momento di campionamento deve essere incluso un gruppo di animali di controllo negativo, cui viene somministrato il solo mezzo disperdente e che sono altrimenti trattati nello stesso modo dei gruppi di trattamento. La percentuale di DNA di coda negli animali del controllo negativo deve rientrare negli intervalli di fondo prestabiliti in laboratorio per ciascun tessuto e momenti di campionamento per la specie considerata (cfr. punto 16). In assenza di dati storici o pubblicati relativi ai controlli, indicanti che il mezzo disperdente scelto, il numero di somministrazioni o la via di somministrazione non inducono effetti deleteri o genotossici, è necessario effettuare studi preliminari prima di avviare lo studio completo al fine di stabilire l'accettabilità del mezzo disperdente da utilizzare per i controlli.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

Benché vi siano pochi dati su animali di sesso femminile sulla cui base effettuare confronti tra i sessi nel caso del test della cometa, in generale le risposte ai test di genotossicità in vivo sono simili tra gli animali di sesso maschile e femminile e, pertanto, la maggior parte degli studi può essere realizzata con animali dell'uno o dell'altro sesso. I dati che evidenziano differenze significative tra maschi e femmine (ad esempio, differenze sul piano della tossicità sistemica, del metabolismo, della biodisponibilità, ecc., comprendenti, ad esempio, dati provenienti da uno studio per determinare l'intervallo di dosi) incoraggiano a utilizzare entrambi i sessi. In questo caso può essere opportuno realizzare uno studio su entrambi i sessi, ad esempio nell'ambito di uno studio di tossicità a dosi ripetute. In caso di uso di entrambi i sessi può essere opportuno ricorrere a un modello fattoriale. Nell'appendice 2 sono riportate informazioni sulle modalità di analisi dei dati in caso di utilizzo di tale modello.

Le dimensioni del gruppo all'inizio dello studio (e in fase di dimostrazione delle competenze) devono essere tali da permettere di disporre di almeno 5 animali analizzabili dello stesso sesso, o di ciascun sesso in caso di utilizzo di entrambi i sessi, per gruppo (e di un numero inferiore nel concomitante gruppo di controllo positivo — cfr punto 29). 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. In relazione al numero massimo di animali generalmente richiesto, a titolo informativo uno studio realizzato sulla base dei parametri di cui al punto 33 con tre gruppi di trattamento, e relativi gruppi di controllo positivo e negativo (ognuno composto da cinque animali dello stesso sesso) richiede tra 25 e 35 animali.

CALENDARIO DI TRATTAMENTO

Gli animali devono ricevere un trattamento quotidiano per un periodo di due giorni o più (ovvero due o più trattamenti a intervalli di circa 24 l'uno dall'altro) e i campioni devono essere raccolti una volta entro 2-6 ore (o a T_{max}) dopo l'ultimo trattamento (12). Possono essere accettati anche campioni provenienti da regimi di trattamento prolungato (ad esempio, dosi quotidiane per 28 giorni). È stato dimostrato che il test della cometa e il test micronucleare di eritrocita possono essere combinati con successo (10) (19). Tuttavia, grande attenzione deve essere dedicata agli aspetti logistici che comporta il prelievo di campioni di tessuti per il test della cometa, rispettando al contempo i requisiti relativi al campionamento di tessuti per altri tipi di valutazioni tossicologiche. Il prelievo 24 ore dopo l'ultima dose, tipico di uno studio generale sulla tossicità, non è appropriato nella maggior parte dei casi (cfr punto 40 sui momenti di campionamento). L'utilizzo di altri calendari di trattamento e di campionamento deve essere giustificato (cfr. appendice 3). Ad esempio, è possibile utilizzare un unico trattamento con campionamento multiplo, sapendo tuttavia che per uno studio che preveda una sola somministrazione è necessario un numero maggiore di animali dato il numero di momenti di campionamento necessari; in alcuni casi tale soluzione può essere preferibile, ad esempio quando la sostanza chimica in esame provoca una tossicità eccessiva a seguito di ripetute somministrazioni.

Qualunque modalità di esecuzione del test è tuttavia accettabile, a condizione che la sostanza chimica in esame dia una risposta positiva o, in caso di risposta negativa, a condizione che si ottenga una risposta diretta o indiretta dell'esposizione del o dei tessuti bersaglio o della tossicità per tali tessuti o qualora venga raggiunta la dose limite (cfr. punto 36).

Per agevolare la somministrazione di un grande volume di sostanze chimiche in esame, quest'ultime possono essere somministrate anche in dosi frazionate, ad esempio in due volte nello stesso giorno, a distanza di 2-3 ore al massimo. In questo caso il campionamento viene fissato in relazione al momento della somministrazione dell'ultima dose (cfr. punto 40).

Livelli di dose

Qualora venga effettuato uno studio preliminare per determinare l'intervallo di dosi, in quanto non sono disponibili dati adeguati da studi pertinenti che forniscano un orientamento in tal senso, tale studio deve essere effettuato nello stesso laboratorio, utilizzando specie, ceppi, sesso e regime di trattamento identici a quelli da utilizzare nello studio principale sulla base delle metodologie attualmente in uso per gli studi sugli intervalli di concentrazione delle dosi. Lo studio deve essere finalizzato a individuare la dose massima tollerata (DMT), definita come la dose che provoca lievi effetti tossici in relazione alla durata dello studio (ad esempio, segnali clinici chiari, quali reazioni o comportamenti anormali, perdita di peso moderata o citotossicità del tessuto interessato), ma che non provoca la morte dell'animale o segni di dolore e sofferenza tali da renderne necessaria la soppressione. Per una sostanza chimica in esame non tossica, con un periodo di somministrazione pari o superiore a 14 giorni, la dose massima (limite) è di 1 000 mg/kg per peso corporeo/giorno. Per periodi di somministrazione inferiori a 14 giorni, la dose massima (limite) è di 2 000 mg/kg per peso corporeo/giorno. Nel caso di talune sostanze chimiche di prova (ad esempio, prodotti farmaceutici per uso umano), oggetto di regolamentazioni specifiche, questi limiti possono subire variazioni.

Le sostanze chimiche che evidenziano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche, o che inducono processi di detossificazione che si traducono in una diminuzione dell'esposizione dopo una somministrazione di lungo termine, possono essere considerate eccezioni rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso.

Nel caso delle versioni acuta e subacuta del test della cometa, oltre alla dose massima (DMT, dose massima possibile, esposizione massima o dose limite), al fine di dimostrare le risposte relative alla dose si deve selezionare, per ciascun momento di campionamento, una serie supplementare di almeno due dosi decrescenti che presentino un intervallo adeguato (di preferenza inferiore a 10). Tuttavia, i livelli di dose utilizzati devono anche, di preferenza, coprire un intervallo che va dalla dose massima alla dose che produce un effetto tossico limitato o nessun effetto tossico. Quando, per tutti i livelli di dose oggetto di studio, viene rilevata tossicità del tessuto bersaglio, è consigliabile effettuare ulteriori studi con dosi non tossiche (cfr. punti 54-55). Gli studi che intendano approfondire l'andamento della curva dose-risposta possono dover ricorrere a uno o più gruppi di trattamento supplementari.

Somministrazione delle dosi

Nella concezione di una prova va considerata la via d'esposizione umana prevista. Pertanto, vie di somministrazione quali alimentazione, acqua da bere, inalazione, impianto, vie topiche, sottocutanee, endovenose, via orale (mediante sonda gastrica) o intratracheale possono essere utilizzate nella misura in cui sono giustificate. In ogni caso, si deve optare per la via che garantisce un'adeguata esposizione del o dei tessuti bersaglio. Le iniezioni intraperitoneali non sono in genere raccomandate in quanto non costituiscono una via di esposizione rappresentativa di quella umana e devono essere usate soltanto in presenza di una giustificazione precisa (ad esempio, nel caso di talune sostanze utilizzate per il controllo positivo o di farmaci somministrati per via intraperitoneale). Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio. Il volume non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori (se consentito dalla legislazione in materia di benessere degli animali) deve essere giustificato. Laddove possibile, i differenti livelli delle dosi devono essere ottenuti adeguando la concentrazione della formulazione somministrata per garantire, a tutti i livelli di dose, un volume costante in relazione al peso corporeo.

Momento di campionamento

Il momento di campionamento è una variabile fondamentale in quanto dipende dal tempo necessario affinché le sostanze chimiche in esame raggiungano la concentrazione massima nel tessuto bersaglio e provochino la rottura del filamento del DNA, ma prima che tali rotture siano rimosse, riparate o provochino la morte della cellula. La durata di determinate lesioni che provocano la rottura di filamenti del DNA, individuate dal test della cometa, può essere molto breve, almeno per alcune sostanze chimiche testate in vitro (52) (53). Ne consegue che, se si sospetta la presenza di tali lesioni transitorie del DNA, è necessario adottare misure per limitarne la sparizione, assicurandosi che i tessuti siano prelevati precocemente, eventualmente prima dei tempi standard riportati di seguito. I periodi di campionamento ottimali possono dipendere dalla sostanza chimica o dalla via di somministrazione, traducendosi, ad esempio, in una rapida esposizione del tessuto in caso di somministrazione per endovena o inalazione. Di conseguenza, i periodi di campionamento sono determinati in funzione dei dati cinetici, se disponibili (ad esempio, tempo (T_{max}) in cui si raggiunge la concentrazione massima (C_{max}) nel plasma o tessuto o allo stato stazionario nel caso di somministrazioni multiple). In assenza di dati cinetici un compromesso accettabile per misurare la genotossicità è quello di effettuare il campionamento 2-6 ore dopo l'ultimo trattamento nel caso di due o più trattamenti o dopo 2-6 ore e 16-26 ore nel caso di una singola somministrazione, avendo cura di effettuare la necropsia di tutti gli animali contemporaneamente dopo l'ultima (o la sola) dose. Per selezionare i momenti di campionamento adeguati possono essere utilizzate, se disponibili, anche informazioni sulla presenza di effetti tossici negli organi bersaglio.

Osservazioni

Osservazioni cliniche generali sulla salute degli animali devono essere effettuate e registrate almeno una volta al giorno, di preferenza ogni giorno alla stessa ora, tenendo conto che, dopo la somministrazione, gli effetti anticipati sono più marcati (54). Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinarne la morbilità e la mortalità. Nel caso di studi di più lunga durata tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana e alla fine della prova. Il consumo di cibo va misurato ad ogni cambio e almeno una volta alla settimana. Se la sostanza chimica in esame è diluita in acqua prima di essere somministrata, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di eccessiva, ma non letale, tossicità vanno soppressi prima della fine del test e non sono di norma utilizzati per il test della cometa.

Raccolta dei tessuti

Poiché è possibile studiare l'induzione delle rotture di filamenti di DNA (comete) in praticamente tutti i tessuti, è necessario definire in modo chiaro le ragioni della selezione dei tessuti, richiamandosi ai motivi alla base dello studio e a eventuali dati relativi all'ADME, alla genotossicità, cancerogenicità e altri dati relativi alla tossicità delle sostanze chimiche in esame. Tra i fattori importanti da tenere in considerazione figurano la via di somministrazione (basata sulle probabili vie di esposizione dell'uomo), la distribuzione e l'assorbimento previsti nei tessuti, il ruolo del metabolismo e i possibili meccanismi di azione delle sostanze chimiche in esame. Tra i tessuti il fegato è quello più frequentemente studiato e per il quale esistono più dati. Pertanto, in assenza di informazioni generali e qualora

non sia stato individuato un tessuto specifico di interesse, la scelta del fegato è giustificata in quanto si tratta del sito principale del metabolismo xenobiotico ed è sovente altamente esposto sia alle sostanze madri sia ai metaboliti. In alcuni casi l'esame di un punto di contatto diretto (ad esempio, per le sostanze chimiche somministrate per via orale, lo stomaco ghiandolare o il duodeno/digiuno o, per le sostanze chimiche inalate, i polmoni) può rivelarsi estremamente importante. Tessuti complementari o differenti possono essere selezionati per ragioni attinenti all'esecuzione del test; può essere tuttavia utile esaminare diversi tessuti provenienti dallo stesso animale, purché il laboratorio abbia dimostrato la propria competenza per tali tessuti e la propria capacità di manipolare diversi tessuti allo stesso tempo.

Preparazione dei campioni

Per le operazioni descritte nei punti che seguono (44-49) è importante che tutte le soluzioni o sospensioni stabili siano utilizzate prima della data di scadenza o, se necessario, siano preparate sul momento. Inoltre, nei punti che seguono, il tempo impiegato per i) rimuovere ciascun tessuto dopo la necropsia, ii) trattare ciascun tessuto per ottenere sospensioni di cellule/nuclei e iii) trattare la sospensione e preparare i vetrini è considerato una variabile critica (cfr. le definizioni nell'appendice 1) e la durata di ciascuna delle operazioni descritte deve essere determinata in fase di definizione del metodo e dimostrazione delle competenze.

Gli animali vengono soppressi conformemente alla legislazione in vigore in materia di benessere degli animali e al principio delle tre R nel o nei momenti adeguati dopo l'ultima somministrazione della sostanza chimica in esame. I tessuti selezionati sono prelevati e sezionati; una porzione è prelevata per il test della cometa e contemporaneamente una sezione della stessa parte di tessuto è tagliata e messa in una soluzione di formaldeide o in un'adeguata soluzione fissativa per un'eventuale analisi istopatologica (cfr. punto 55) applicando i metodi standard (12). Il tessuto destinato al test della cometa è messo in un tampone di macerazione, è lavato accuratamente con tale tampone per rimuovere il sangue residuo e conservato in un tampone di macerazione refrigerato fino al trattamento. Si può inoltre realizzare una perfusione *in situ*, ad esempio, per il fegato e i reni.

In letteratura sono pubblicati diversi metodi per l'isolamento delle cellule/nuclei. Tra questi figurano la macerazione di tessuti quali il fegato e i reni, il raschiamento delle mucose nel caso del tratto gastrointestinale, l'omogeneizzazione e la digestione enzimatica. Poiché lo studio di convalida del JaCVAM si è limitato allo studio di cellule isolate, l'uso di queste ultime va privilegiato per poter definire il metodo e fare riferimento ai dati sperimentali del JaCVAM nella fase di dimostrazione delle competenze. Tuttavia è stato dimostrato che l'uso di cellule isolate o di nuclei non produceva differenze significative nei risultati del test della cometa. Anche l'applicazione di metodi differenti per isolare le cellule/nuclei (ad esempio, omogeneizzazione, macerazione, digestione enzimatica e filtrazione con setaccio) ha prodotto risultati comparabili (55). Di conseguenza è possibile utilizzare sia cellule isolate sia nuclei. I laboratori devono valutare e convalidare accuratamente i metodi di isolamento di cellule/nuclei in funzione del tipo di tessuto. Come indicato al punto 40, la durata di determinate lesioni che provocano la rottura di filamenti del DNA, individuate dal test della cometa, può essere molto breve (52) (53). Pertanto, qualunque sia il metodo utilizzato per preparare le sospensioni delle singole cellule/nuclei, è importante che i tessuti siano trattati prima possibile dopo la soppressione degli animali e conservati in condizioni tali da evitare la scomparsa delle lesioni (ad esempio, mantenendo il tessuto a temperature basse). Le sospensioni contenenti le cellule devono essere conservate a temperature molto basse fino a quando possono essere utilizzate, così da poter evidenziare una differenza minima tra i campioni e adeguate risposte dei controlli positivi e negativi.

PREPARAZIONE DEI VETRINI

La preparazione dei vetrini deve avvenire il prima possibile dopo la preparazione delle cellule /nuclei (idealmente entro un'ora), ma la temperatura e il tempo intercorso tra la soppressione dell'animale e la preparazione dei vetrini devono essere rigorosamente controllati e validati in condizioni di laboratorio. Il volume della sospensione contenente le cellule aggiunta all'agarosio con basso punto di fusione (in genere 0,5-1,0 %) per preparare i vetrini non deve ridurre la percentuale di agarosio con basso punto di fusione a meno di 0,45 %. La densità ottimale delle cellule viene determinata con il sistema di analisi delle immagini utilizzato per il conteggio delle comete.

Lisi

Anche le condizioni di lisi costituiscono una variabile critica e possono interferire con le rotture di filamenti derivanti dalle modifiche di specifici tipi di DNA (alchilazioni e addotti alla base del DNA). Si raccomanda pertanto di mantenere le condizioni di lisi il più costanti possibile per tutti i vetrini di uno stesso esperimento. Una volta pronti, i vetrini devono essere immersi in una soluzione di lisi refrigerata per almeno un'ora (o tutta la notte) a una temperatura di 2-8 °C in condizioni di luce attenuata, ad esempio luce gialla o ambiente a tenuta di luce, per evitare l'esposizione alla luce bianca che può contenere componenti UV. Dopo il periodo di incubazione i vetrini devono essere lavati per rimuovere il detergente o i sali residui prima della fase alcalina. A tal fine si può utilizzare acqua depurata, un tampone neutralizzante o un tampone fosfato o anche un tampone di elettroforesi. In questo modo è possibile mantenere le condizioni alcaline nella camera di elettroforesi.

Svolgimento e elettroforesi

I vetrini sono piazzati a caso sulla piattaforma di un'unità di elettroforesi di tipo sottomarino contenente una soluzione di elettroforesi in quantità sufficiente per coprire completamente le superfici dei vetrini (anche la profondità di immersione deve essere costante tra le serie). In altri tipi di unità di elettroforesi utilizzate per il test della cometa, a raffreddamento attivo, circolazione del liquido di raffreddamento e alimentazione in alta tensione, l'intensità della corrente elettrica, a tensione costante, è tanto più elevata quanto più è consistente la copertura della soluzione. È necessario ripartire i vetrini in modo equilibrato nella vaschetta dell'elettroforesi per limitare gli effetti di eventuali tendenze o gli effetti di bordo all'interno della vaschetta o per ridurre al minimo le variazioni tra i lotti; per questi motivi in ciascuna sequenza di elettroforesi si deve utilizzare lo stesso numero di vetrini provenienti dallo stesso animale, nonché campioni di differenti gruppi di trattamento, controlli positivi e negativi. I vetrini devono restare per almeno 20 minuti nella vaschetta per consentire lo svolgimento del DNA e quindi essere sottoposti a elettroforesi in condizioni controllate che permettano di massimizzare la sensibilità e l'intervallo dinamico del test (per ottenere percentuali accettabili di DNA di coda, nei controlli positivi e negativi, e massimizzare così la sensibilità). Il grado di migrazione del DNA è associato in modo lineare alla durata dell'elettroforesi oltre che al potenziale (V/cm). Secondo lo studio del JaCVAM quest'ultimo potrebbe essere pari a 0,7 V/cm per almeno 20 minuti. La durata dell'elettroforesi è considerata una variabile critica e dovrebbe essere impostata in modo da ottimizzare l'intervallo dinamico. Tempi di elettroforesi più lunghi (ad esempio, 30 o 40 minuti per massimizzare la sensibilità) si traducono in genere in risposte positive più nette nel caso di mutageni conosciuti. Tuttavia, tempi di elettroforesi più lunghi possono determinare anche una migrazione eccessiva nei campioni di controllo. Ogni esperimento deve essere realizzato a tensione costante e la variabilità degli altri parametri deve essere contenuta all'interno di un intervallo ristretto e definito; a titolo di esempio, nello studio del JaCVAM, 0,7 V/cm con un'intensità iniziale di 300 mA. La profondità del tampone deve essere in funzione delle condizioni richieste e va mantenuta per tutto l'esperimento. Si deve registrare la corrente all'inizio e alla fine della fase di elettroforesi. Le condizioni ottimali devono pertanto essere determinate nella fase iniziale di dimostrazione delle competenze del laboratorio con ciascun tessuto oggetto di studio. La temperatura della soluzione di elettroforesi in fase di svolgimento e elettroforesi deve essere mantenuta a un livello ridotto, di solito 2-10 °C (10). Si deve registrare la temperatura della soluzione di elettroforesi in fase di svolgimento e all'inizio e alla fine dell'elettroforesi.

Una volta conclusa l'elettroforesi i vetrini devono essere immersi/lavati nel tampone neutralizzante per almeno 5 minuti. I gel possono essere colorati e osservati allo stato "fresco" (ad esempio, entro 1-2 giorni) oppure essere disidratati e analizzati in una fase successiva (ad esempio, 1-2 settimane dopo la colorazione) (56). Tuttavia, le condizioni devono essere convalidate durante la dimostrazione di competenza e, per ciascuna delle opzioni, è necessario acquisire, e conservare separatamente, dati storici. Qualora si opti per la seconda possibilità, i vetrini sono disidratati per immersione di almeno cinque minuti in etanolo assoluto, sono lasciati asciugare all'aria aperta e conservati a temperatura ambiente o in un recipiente in frigorifero fino alla lettura.

Metodi di misurazione

Per la valutazione quantitativa delle comete si utilizzano sistemi di analisi dell'immagine parzialmente o totalmente automatizzati. I vetrini sono colorati utilizzando un adeguato colorante fluorescente, ad esempio SYBR Gold, Green I, ioduro di propidio o bromuro di etidio, e sono misurati con un ingrandimento adeguato (ad esempio, 200x) utilizzando un microscopio a epifluorescenza munito di rilevatori adeguati o di una fotocamera digitale (ad esempio, CCD).

Le cellule possono essere classificate in tre categorie, come descritto nell'atlante delle immagini delle comete (57), ovvero cellule misurabili, non misurabili e "fantasma" (cfr. punto 56 per una discussione più approfondita). Per evitare artefatti, soltanto le cellule misurabili (con testa e coda chiaramente definite e nessuna interferenza da parte di cellule vicine) possono essere classificate in funzione della percentuale di DNA di coda. Non è necessario registrare la frequenza delle cellule non misurabili. La frequenza delle cellule fantasma è determinata sulla base di un esame visivo (in quanto l'assenza di una testa chiaramente definita ne rende difficile l'individuazione mediante analisi dell'immagine) di almeno 150 cellule per campione (cfr. punto 56 per ulteriori informazioni) e documentata a parte.

Tutti i vetrini dell'analisi, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati individualmente ed esaminati "alla cieca" affinché la persona che effettua l'analisi non sappia a quale trattamento corrispondono. Per ciascun campione (per tessuto e per animale) si devono analizzare almeno 150 cellule (escluse le cellule fantasma — cfr. punto 56). L'analisi di 150 cellule per animale in almeno 5 animali per dose (ma in un numero inferiore nel concomitante controllo positivo — cfr. punto 29) garantisce una potenza statistica adeguata secondo l'analisi di Smith *et al.*, 2008 (5). Se sono utilizzati i vetrini, ciò può corrispondere a 2 o 3 vetrini analizzati per campione quando sono utilizzati cinque animali per gruppo. È necessario osservare diverse aree del vetrino a una densità tale da garantire che non vi sia sovrapposizione delle code. Va evitata la valutazione ai margini del vetrino.

Le rotture di filamenti di DNA nel test della cometa possono essere misurate sulla base di parametri indipendenti, quali la percentuale di DNA di coda, la lunghezza della coda e il momento di coda. Le tre misurazioni possono essere effettuate utilizzando un programma adeguato di analisi dell'immagine. Tuttavia, la percentuale del DNA di coda (nota anche come intensità percentuale di coda) è il parametro raccomandato per la valutazione e l'interpretazione dei risultati (12) (40) (41) (42) ed è determinata dall'intensità dei frammenti di DNA nella coda espressa come percentuale dell'intensità totale della cellula (13).

Lesioni dei tessuti e citotossicità

Risultati positivi nel test della cometa possono non essere dovuti esclusivamente alla genotossicità e la tossicità del tessuto bersaglio può anche tradursi in un aumento della migrazione del DNA (12) (41). Al contrario, una citotossicità bassa o moderata viene spesso riscontrata in presenza di sostanze genotossiche conosciute (12), dimostrando che il test della cometa da solo non consente di distinguere la migrazione del DNA indotta dalla genotossicità rispetto a quella provocata dalla citotossicità. Tuttavia, quando si osserva un aumento nella migrazione del DNA, si raccomanda di effettuare l'esame di uno o più indicatori della citotossicità come ausilio all'interpretazione dei risultati. Un aumento della migrazione del DNA in presenza di chiari segni di citotossicità deve essere interpretato con cautela.

Tra i numerosi criteri di valutazione della citotossicità proposti, le alterazioni istopatologiche sono considerate un criterio pertinente per valutare la tossicità dei tessuti. La migrazione del DNA è stata associata anche a infiammazioni, infiltrazioni cellulari, cambiamenti apoptotici o necrotici; tuttavia, come dimostrato dallo studio di convalida del JaCVAM (12), non si dispone di un elenco definitivo dei cambiamenti istopatologici che sono sempre associati a un aumento della migrazione del DNA. Anche i cambiamenti che interessano alcuni parametri biologici (ad esempio, AST, ALT) possono fornire utili informazioni sui danni ai tessuti; possono inoltre essere considerati anche altri indicatori, quali l'attivazione delle caspasi, la rilevazione delle cellule in fase di apoptosi con il metodo TUNEL, la colorazione con annessina V, ecc. Tuttavia i dati pubblicati in relazione all'utilizzo di tali indicatori negli studi *in vivo* sono pochi e non tutti affidabili.

Le cellule fantasma sono cellule la cui immagine al microscopio consiste di una testa di piccole dimensioni, se non inesistente, e di una grande coda diffusa e, per quanto la causa di questo fenomeno sia incerta (cfr. appendice 3), sono considerate cellule fortemente danneggiate. Dato l'aspetto di tali cellule, la misurazione della percentuale di DNA di coda mediante l'analisi dell'immagine è inaffidabile; le cellule fantasma devono pertanto essere analizzate a parte. La presenza di cellule fantasma deve essere rilevata e registrata e un loro eventuale aumento che si ritiene sia dovuto alla sostanza chimica in esame deve essere analizzato e interpretato con attenzione. A tal fine può aiutare la conoscenza del meccanismo di azione potenziale delle sostanze chimiche in esame.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

Poiché l'unità sperimentale è data dall'animale è opportuno presentare in forma di tabella sia i risultati relativi ai singoli animali sia la sintesi dei risultati. Data la natura gerarchica dei dati, si raccomanda di determinare la percentuale mediana di DNA di coda per ciascun vetrino e di calcolare per ciascun animale la media dei valori della mediana (12). La media di un gruppo è quindi determinata facendo la media delle medie individuali dei gruppi che lo compongono. Tutti questi valori devono essere riportati nella relazione. Metodologie alternative (cfr. punto 53) sono ammesse, purché scientificamente e statisticamente giustificate. L'analisi statistica può essere svolta applicando diverse metodologie (58) (59) (60) (61). Nel selezionare i metodi statistici da utilizzare si deve tenere conto dell'eventuale necessità di trasformare i dati (ad esempio, in logaritmi o radici quadrate) e/o di aggiungere un numero piccolo (ad esempio, 0,001) a tutti i valori (anche a quelli non nulli), per attenuare l'incidenza dei valori nulli, come illustrato nei riferimenti sopracitati. Nell'appendice 2 sono riportate informazioni sulle interazioni trattamento/ sesso, quando vengono utilizzati entrambi i sessi e la successiva analisi dei dati a seconda che siano riscontrate o no differenze. Nella relazione devono figurare inoltre dati sulla tossicità e i segni clinici.

Criteri di accettabilità

L'accettazione dei risultati di una prova si basa sui criteri seguenti:

- a. i dati relativi al concomitante controllo negativo si considerano accettabili ai fini della loro aggiunta alla banca dati storica del laboratorio sui controlli negativi, come illustrato al punto 16;
- b. i concomitanti controlli positivi (cfr. punto 29) devono provocare risposte compatibili con quelle generate nella banca dati storica dei controlli positivi e produrre un incremento statisticamente significativo rispetto ai concomitanti controlli negativi;
- c. è stato analizzato un numero adeguato di cellule e dosi (punti 52 e 36-38);
- d. i criteri di selezione della dose più elevata sono coerenti con quelli descritti al punto 36.

Analisi e interpretazione dei risultati

A condizione che siano stati rispettati tutti i criteri di accettabilità, una sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se:

- a. almeno una delle dosi sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;
- b. un metodo adeguato di analisi della tendenza evidenzia che l'aumento è collegato alla dose;
- c. taluni risultati si collocano al di fuori della distribuzione dei dati dei controlli negativi storici per una data specie, mezzo disperdente, tessuto e numero di somministrazioni.

Se sono rispettati tutti i criteri di cui sopra, si ritiene che la sostanza chimica in esame sia in grado di provocare rotture dei filamenti di DNA nei tessuti studiati nel presente sistema di prova. Si veda il punto 62 se sono soddisfatti soltanto uno o due dei criteri summenzionati.

A condizione che siano stati rispettati tutti i criteri di accettabilità, una sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se:

- a. nessuna delle concentrazioni sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;
- b. un metodo adeguato di analisi della tendenza evidenzia che non vi è un aumento correlato alla concentrazione;
- c. tutti i risultati si collocano all'interno della distribuzione dei dati dei controlli negativi storici per una data specie, mezzo disperdente, tessuto e numero di somministrazioni;
- d. vi sia prova diretta o indiretta dell'esposizione del o dei tessuti bersaglio o della tossicità per tali tessuti.

In questi casi si ritiene che la sostanza chimica in esame non sia in grado di provocare rotture dei filamenti di DNA nei tessuti studiati nel presente sistema di prova.

Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva o negativa.

Qualora la risposta non sia né chiaramente positiva né chiaramente negativa (ovvero non sono rispettati tutti i criteri elencati ai punti 59 e 60), e al fine di stabilire la rilevanza biologica di un risultato, i dati devono essere sottoposti alla valutazione di esperti e/o devono essere effettuati ulteriori accertamenti, se ciò è scientificamente giustificato. Può essere utile, se del caso, analizzare cellule supplementari o ripetere l'esperimento, eventualmente in condizioni sperimentali migliori (ad esempio, intervallo tra le dosi, altre vie di somministrazione, momenti campionamento diversi, altri tessuti).

In rari casi, anche dopo ulteriori analisi, quando la serie di dati non consente di valutare i risultati come positivi o negativi, i risultati sono dichiarati ambigui.

Per valutare la rilevanza biologica di un risultato positivo o ambiguo, sono necessarie informazioni sulla citotossicità del tessuto bersaglio (cfr. punti 54-55). Se risultati positivi o ambigui sono riscontrati soltanto in presenza di chiare indicazioni di citotossicità, lo studio è dichiarato ambiguo per quanto riguarda la genotossicità, a meno di non possedere sufficienti informazioni che permettano di trarre conclusioni definitive. Qualora lo studio dia un risultato negativo in presenza di segni di tossicità con tutte le dosi sperimentali, può essere consigliabile effettuare un ulteriore studio con dosi non tossiche.

Relazione sulla prova

La relazione deve comprendere i seguenti dati:

Sostanza chimica in esame

- origine, numero del lotto se disponibile;
- stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo, data della nuova analisi, se nota.

Sostanza mono-costituente

- apparenza fisica, idrosolubilità, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- identificazione chimica, quale nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e praticabile, ecc.

Sostanza multi-costituente, UVCB e miscele:

- caratterizzazione, nella misura del possibile mediante identità chimica (vedi sopra), proporzioni quantitative e pertinenti proprietà fisico-chimiche dei costituenti.

Solvente/mezzo disperdente:

- motivazione della scelta del solvente/mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;
- preparazione delle formulazioni delle dosi;
- determinazione analitica dei preparati (ad esempio, stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali).

Animali da esperimento:

- specie/ceppo utilizzato e giustificazioni scientifiche ed etiche della scelta effettuata;
- numero, età e sesso degli animali;

- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, arricchimento ecc.;
- peso dei singoli animali all'inizio e alla fine del test, con intervallo, media e deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni sperimentali:

- dati sui controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);
- risultati dello studio per determinare l'intervallo delle dosi, se effettuato;
- criteri di selezione delle dosi;
- dettagli della preparazione della sostanza in esame;
- modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;
- criteri di selezione della via di somministrazione;
- punto dell'iniezione (nel caso degli studi per via sottocutanea o endovenosa);
- metodo di preparazione dei campioni, se disponibile, analisi istopatologiche, soprattutto nel caso di una sostanza chimica che dà un risultato positivo al test della cometa;
- motivazione della scelta del tessuto;
- metodi atti a verificare che la sostanza in esame ha raggiunto il tessuto bersaglio o la circolazione sanguigna, se i risultati sono negativi;
- dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;
- dettagli relativi alla qualità della dieta e dell'acqua;
- descrizione dettagliata dei tempi necessari per il trattamento e il campionamento e giustificazione delle scelte (ad esempio dati tossicocinetici, se disponibili);
- metodi di attenuazione del dolore, analgesici;
- metodo di soppressione degli animali;
- procedure di isolamento e di conservazione dei tessuti;
- metodo utilizzato per preparare le sospensioni delle singole cellule/nuclei;
- origine e numeri di lotto di tutti i reagenti (laddove possibile);
- metodi di valutazione della citotossicità;
- condizioni dell'elettroforesi;
- tecniche di colorazione utilizzate; e
- metodi di valutazione e misurazione delle comete.

Risultati:

- Eventuali osservazioni cliniche generali, prima e durante il test per ogni animale;
- prove della citotossicità, se del caso;
- per studi di durata superiore alla settimana: peso dei singoli animali durante lo studio, con intervallo di peso, media e deviazione standard per ciascun gruppo; consumo di cibo;

- relazione dose-risposta, se evidente;
- per ciascun tessuto/animale, percentuale di DNA di coda (o eventuali altre misurazioni scelte) e valori mediani per vetrino, valori medi per animale e valori medi per gruppo;
- dati sui controlli negativi storici e concomitanti, con intervalli, medie/mediane e deviazioni standard per ciascun tessuto studiato;
- dati sui controlli positivi concomitanti e storici;
- per i tessuti diversi dal fegato, la curva dose-risposta utilizzando il controllo positivo. La curva può essere stabilita utilizzando i dati raccolti in fase di dimostrazione delle competenze (cfr. i punti 16-17) e deve essere opportunamente giustificata, richiamandosi alla letteratura attuale, dimostrando che l'ampiezza e la dispersione delle risposte ai controlli nei tessuti studiati sono appropriate;
- analisi statistiche e metodi applicati; e criteri in base ai quali una risposta è considerata positiva, negativa o ambigua;
- frequenza delle cellule fantasma in ciascun gruppo e per animale.

Discussione dei risultati

Conclusione

Riferimenti

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The in vivo Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The in vitro and in vivo Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- (5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.
- (6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.
- (8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.
- (9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.
- (10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.
- (11) 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.

- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.
- (16) 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. 108-20.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145-54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the in vivo Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.
- (20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.
- (23) Nessler, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.
- (25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), Use of the in vivo skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.
- (26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.
- (27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.
- (28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.
- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.
- (37) Pfuhrer, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.
- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605 (1-2), pp. 7-16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.
- (44) Møller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.
- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)
- (50) Capitolo B.8 del presente allegato, Tossicità subacuta per inalazione: studio a 28 giorni.
- (51) Capitolo B.29 del presente allegato, Tossicità subacuta per inalazione: studio a 90 giorni.
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.
- (54) OECD (2002), "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.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for in vivo rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.
- (56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45-51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.
- (60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

Elettroforesi di cellule isolate in gel in condizioni alcaline: tecnica sensibile per l'individuazione di lesioni primarie del DNA a livello di singole cellule/nuclei.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Cometa: la forma, simile a quella di una cometa, che i nucleotidi assumono dopo essere stati esposti a un campo elettroforetico: la testa corrisponde al nucleo e la coda è costituita dal DNA che migra al di fuori del nucleo nel campo elettrico.

Parametro critico/variabile critica: la variabile di un protocollo per il quale una piccola modifica può avere un grande impatto sulla conclusione del test. Le variabili critiche possono essere specifiche di un tessuto. Le variabili critiche non devono essere modificate, soprattutto nell'ambito di un test, senza tenere conto dell'incidenza che tali modifiche possono avere sulla risposta al test, come indicato ad esempio dall'ampiezza e dalla variabilità della risposta dei controlli positivi e negativi. La relazione sulla prova deve precisare le modifiche apportate alle variabili critiche nel corso del test o in rapporto al protocollo standard del laboratorio e fornire una giustificazione di ogni modifica.

Intensità della coda o percentuale del DNA di coda: corrisponde all'intensità della coda della cometa in rapporto all'intensità totale (testa più coda). Essa riflette la portata (espressa in percentuale) delle lesioni del DNA.

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

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o i materiali origine biologica.

Appendice 2

MODELLO FATTORIALE PER INDIVIDUARE LE DIFFERENZE TRA I SESSI NEL TEST DELLA COMETA IN VIVO**Modello fattoriale e relativa 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.

- (1) 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.
- (2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.
- (3) 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.

⁽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.

-
- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
 - (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
 - (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
 - (7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

Appendice 3

LIMITI ATTUALI DEL TEST

Allo stato attuale delle conoscenze, il test della cometa in vivo presenta diversi limiti. Ci si aspetta che tali limiti siano ridotti, o che siano definiti in modo più preciso via via che la maggiore esperienza acquisita nell'applicazione del test fornirà risposte alle questioni di sicurezza in un contesto regolamentare.

1. Alcuni tipi di lesioni del DNA possono essere di breve durata, ovvero possono essere riparate in tempi troppo rapidi per poter essere osservate 24 ore o più dopo la somministrazione dell'ultima dose. Non esiste un elenco convalidato dei tipi di lesioni di breve durata, né delle sostanze chimiche che sono probabilmente alla base di tali tipi di lesioni; si ignora altresì l'arco temporale durante il quale tali tipi di lesioni sono individuabili. I momenti ottimali per il campionamento possono inoltre essere specificamente legati alla sostanza chimica o alla via di somministrazione e i momenti di campionamento devono essere determinati in funzione dei dati cinetici, (ad esempio, il tempo T_{max} in cui si raggiunge la concentrazione massima nel plasma o tessuto) quando tali dati sono disponibili. La maggior parte degli studi su cui si basa il presente metodo di prova sostengono che la necropsia deve intervenire nelle 2-3 ore che seguono la somministrazione dell'ultima dose. La maggior parte degli studi pubblicati indicano che l'ultima dose deve essere somministrata dalle 2 alle 6 ore prima della soppressione dell'animale. È su tale base che il presente metodo di prova raccomanda che, in assenza di dati che inducano a procedere in modo diverso, la dose finale sia somministrata in un momento preciso compreso tra 2 e 6 ore prima della necropsia.
2. Non si dispone di dati convalidati relativi alla sensibilità del test per l'individuazione di lesioni del DNA di breve durata successive alla somministrazione di una sostanza negli alimenti o nell'acqua da bere rispetto alla somministrazione con sonda gastrica. Lesioni del DNA sono state individuate a seguito della somministrazione di una sostanza negli alimenti o nell'acqua da bere ma gli studi condotti con questo tipo di somministrazione sono relativamente poco numerosi rispetto all'esperienza, molto maggiore, acquisita con la somministrazione mediante sonda gastrica o per via intraperitoneale. La sensibilità del test potrebbe pertanto essere ridotta nel caso delle sostanze chimiche che provocano lesioni di breve durata, quando sono somministrate con gli alimenti e l'acqua da bere.
3. Poiché non esistono studi inter-laboratorio su tessuti diversi dal fegato e dallo stomaco, non sono state elaborate raccomandazioni sulle modalità per ottenere una risposta sensibile e riproducibile in tessuti diversi dal fegato, indicando ad esempio gli intervalli attesi per i controlli positivi e negativi. Nel caso del fegato non è stato possibile trovare un accordo sull'abbassamento del limite per i valori dei controlli negativi.
4. Benché esistano diverse pubblicazioni che dimostrano che la citotossicità in vitro possa indurre a interpretazioni erranee, sono stati pubblicati pochissimi dati in vitro e, pertanto, non è possibile raccomandare una particolare misura di citotossicità. La migrazione del DNA è stata associata anche a mutamenti istopatologici quali infiammazioni, infiltrazioni cellulari, cambiamenti apoptotici o necrotici; tuttavia, come dimostrato dallo studio di convalida del JaCVAM (OCSE, 2014), tali cambiamenti non sempre si accompagnano a risultati positivi nel test della cometa e, pertanto, non si dispone di un elenco definitivo dei cambiamenti istopatologici che sono sempre associati a un aumento della migrazione del DNA. È stato proposto di utilizzare le cellule fantasma come indicatore della citotossicità ma l'eziologia di queste cellule resta incerta. Secondo taluni dati le cellule fantasma potrebbero essere il prodotto della citotossicità della sostanza chimica, dei danni di tipo meccanico/enzimatico provocati in fase di preparazione del campione (Guerard *et al.*, 2014) e/o di un effetto estremo della genotossicità della sostanza chimica in esame. Altri dati sembrerebbero indicare che esse sono provocate da lesioni del DNA estese ma forse riparabili (Lorenzo *et al.*, 2013).
5. È stato dimostrato che è possibile congelare i tessuti o i nuclei delle cellule al fine di analizzarli in una fase successiva. Ciò permette in genere di ottenere un effetto misurabile sulla risposta al mezzo disperdente e al controllo positivo (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Se il laboratorio ricorre a questa pratica, deve dimostrare la propria competenza nelle metodologie di congelamento e confermare che le percentuali di DNA di coda nei tessuti bersaglio degli animali trattati con il mezzo disperdente sono a livelli sufficientemente bassi e che è possibile individuare risposte positive. In letteratura sono descritte diverse metodologie per il congelamento dei tessuti. Allo stato attuale, tuttavia, non vi è accordo sulle migliori modalità per congelare e scongelare i tessuti e per valutare se una risposta potenzialmente alterata possa incidere sulla sensibilità del test.
6. Studi recenti dimostrano che l'elenco delle variabili critiche potrebbe continuare a diminuire e che i parametri relativi a tali variabili potrebbero essere definiti con maggiore precisione (Guerard *et al.*, 2014).

Riferimenti

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.
- (2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.
- (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.
- (4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.
- (6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.»