

## «B.53. STUDIO DELLA NEUROTOSSICITÀ NELLA FASE DELLO SVILUPPO

### INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 426 per le prove sulle sostanze chimiche (2007). Nel giugno del 1995, il gruppo di lavoro dell'OCSE sulla tossicità per la riproduzione e lo sviluppo, riunito a Copenaghen, ha esaminato la necessità di aggiornare le linee guida OCSE esistenti in materia e metterne a punto delle nuove per gli endpoint non ancora contemplati (1). Il gruppo di lavoro ha raccomandato che la linea guida per le prove volte a determinare la neurotossicità nella fase dello sviluppo sia redatta in base ad un orientamento dell'agenzia statunitense per la protezione dell'ambiente (EPA), che nel frattempo è stato riveduto (2). Nel giugno del 1996 si è tenuta a Copenaghen una seconda riunione di consultazione, intesa ad elaborare indicazioni più precise che servissero al segretariato per definire una nuova linea guida per le prove sulla neurotossicità nella fase dello sviluppo, a partire dagli elementi principali, quali i dettagli relativi alla scelta della specie animale, il periodo di somministrazione, il periodo di sperimentazione, gli endpoint da esaminare, nonché i criteri per la valutazione dei risultati. Nel 1998 è stata pubblicata una linea guida statunitense per la valutazione del rischio di neurotossicità (3). Nell'ottobre del 2000 si è tenuta una riunione di consultazione di esperti dell'OCSE in parallelo ad un seminario dell'ILSI (Istituto internazionale per le scienze della vita), mentre un'ulteriore riunione di consultazione degli esperti ha avuto luogo a Tokyo nel 2005. Questi incontri sono stati organizzati per discutere le questioni scientifiche e tecniche relative alla linea guida vigente e le raccomandazioni che ne sono scaturite sono state prese in considerazione in sede di elaborazione del presente metodo di prova (4)(5)(6)(7). I documenti d'orientamento dell'OCSE n. 43, *Reproductive Toxicity Testing and Assessment* (8), e n. 20, *Neurotoxicity Testing* (9), contengono ulteriori informazioni sull'esecuzione, sull'interpretazione e sulla terminologia utilizzata per il presente metodo di prova.

### CONSIDERAZIONI INIZIALI

2. Gli effetti neurotossici prodotti da alcune sostanze chimiche sugli esseri umani e su altre specie nella fase dello sviluppo sono noti (10)(11)(12)(13). Per esaminare e valutare le caratteristiche tossiche di una sostanza chimica può essere necessario determinarne il potenziale di neurotossicità nella fase dello sviluppo. Gli studi di neurotossicità nella fase dello sviluppo sono intesi a fornire dati, comprese le caratterizzazioni dose-risposta, relativi ai potenziali effetti funzionali e morfologici sullo sviluppo del sistema nervoso della progenie imputabili all'esposizione in utero e nei primi stadi di vita.
3. Questo tipo di studio può essere a sé stante, costituire parte integrante di uno studio di tossicità per la riproduzione e/o di uno studio di neurotossicità nell'adulto [ad esempio, i metodi di prova B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)], oppure fungere da complemento ad uno studio di tossicità per lo sviluppo prenatale [ad esempio, il metodo di prova B.31 (17)]. Quando lo studio di neurotossicità nella fase dello sviluppo è integrato o collegato ad un altro studio, è necessario preservare l'integrità di entrambi. Tutte le prove devono conformarsi alla legislazione applicabile oppure alle linee guida per l'uso di animali da laboratorio nella ricerca, nazionali o sovranazionali (cfr. nota 18).
4. Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue la prova deve tenere conto di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame, in particolare riguardo a identità, struttura e proprietà fisico-chimiche, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo, i dati tossicologici sulle sostanze chimiche di struttura affine e l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per dimostrare a tutti i soggetti interessati l'adeguatezza della prova per la protezione della salute umana e servono a scegliere la giusta dose iniziale.

### PRINCIPIO DELLA PROVA

5. La sostanza in esame viene somministrata agli animali durante la gestazione e la lattazione. Le madri sono sottoposte a prova per esaminare gli effetti nelle femmine durante la gravidanza e la lattazione e per ottenere, all'occorrenza, informazioni comparative (rispetto alla progenie). La valutazione della neurotossicità è effettuata su discendenti scelti a caso all'interno delle nidiate e consiste in osservazioni volte a rilevare anomalie neurologiche e comportamentali macroscopiche, attraverso l'esame dello sviluppo fisico, dell'ontogenesi del comportamento, dell'attività motoria, della funzione motoria e sensoriale, dell'apprendimento e della memoria, come pure mediante la valutazione del peso del cervello e della neuropatologia durante lo sviluppo postnatale e in età adulta.

6. Se la prova costituisce uno studio a sé stante, è possibile applicare sugli animali supplementari disponibili in ogni gruppo protocolli specifici valutativi del neurocomportamento, della neuropatologia, della neurochimica o dell'elettrofisiologia, che possono completare i dati ottenuti mediante gli esami raccomandati nel presente metodo di prova (16)(19)(20)(21). Questi protocolli integrativi, che possono essere applicati sia sulle madri che sui figli, possono rivelarsi particolarmente utili quando l'osservazione empirica, gli effetti previsti o il meccanismo/modo di azione indicano un tipo specifico di neurotossicità. Possono anche essere utilizzati protocolli ex vivo o in vitro, purché non alterino l'integrità dei protocolli in vivo.

#### PREPARAZIONE DELLA PROVA

##### **Selezione della specie animale**

7. La specie sperimentale preferita è il ratto, ma si possono eventualmente usare anche altre specie. Si tenga presente, tuttavia, che il numero di giorni di gestazione e di sviluppo postnatale considerato nel presente metodo di prova si riferisce ai ceppi di ratti più utilizzati e pertanto, in caso si faccia uso di una specie diversa o di un ceppo inabituale, è necessario che tale numero di giorni si equivalga. L'uso di un'altra specie deve essere giustificata, oltre che sulla base di dati tossicologici, farmacocinetici e/o di altra natura, sulla disponibilità di esami neurocomportamentali e neuropatologici postnatali specifici della specie in questione. Se una prova precedente ha prodotto risultati preoccupanti, occorre considerare la specie o il ceppo da cui sono ottenuti. Poiché i diversi ceppi di ratto rispondono in modo diverso alle prove, si devono fornire elementi attestanti che il ceppo selezionato presenta fecondità e reattività adeguate. Se si utilizzano altre specie occorre documentarne l'attendibilità e la sensibilità dal punto di vista della determinazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo.

##### **Condizioni di stabulazione e alimentazione**

8. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C ( $\pm$  3 °C). L'umidità relativa deve mantenersi intorno al 50-60 %; in ogni caso non è inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12:12 (luce/buio). È anche possibile invertire il fotoperiodo prima dell'accoppiamento e per tutta la durata dello studio, al fine di verificare gli endpoint funzionali e comportamentali durante il periodo di oscurità (con luce rossa), ossia nel periodo di normale attività degli animali (22). Qualsiasi modifica del fotoperiodo deve prevedere un periodo di acclimatazione sufficiente perché gli animali possano adattarsi. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. È necessario indicare nella relazione il tipo di cibo e d'acqua e analizzare entrambi per ricercare la presenza di contaminanti.
9. Gli animali possono essere alloggiati individualmente o in piccoli gruppi dello stesso sesso. L'accoppiamento va effettuato in gabbie adeguate allo scopo. Dopo che è stata comprovata l'avvenuta copulazione oppure al più tardi il 15° giorno di gestazione, le femmine fecondate sono alloggiate separatamente in gabbie apposite per il parto o la gestazione. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Quando si avvicina il momento del parto occorre fornire alle femmine gravide materiale specifico adatto per la preparazione del nido. È noto che una manipolazione inadeguata o condizioni di stress durante la gravidanza possono provocare effetti indesiderati, compreso un aborto o uno sviluppo fetale o postnatale alterato. Per evitare la mortalità fetale dovuta a fattori che non dipendono dall'esposizione alla sostanza in esame, gli animali vanno maneggiati con cautela durante la gravidanza, evitando di sottoporli a stress causato da fattori esterni, come ad esempio l'eccessivo rumore.

##### **Preparazione degli animali**

10. Si utilizzano animali sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio e non siano stati sottoposti a precedenti procedure sperimentali, a meno che lo studio faccia parte di un altro studio (cfr. paragrafo 3). Gli animali sperimentali devono essere caratterizzati sotto il profilo di specie, ceppo, provenienza, sesso, peso ed età. Ogni animale riceve un numero di identificazione unico, con il quale viene marchiato. Gli animali di tutti i gruppi sperimentali devono essere, per quanto possibile, uniformi per età e peso e rientrare nella gamma normale di valori della specie e del ceppo studiati. Per ciascun livello di dose si utilizzano giovani femmine adulte nullipare. I fratelli e le sorelle non vanno fatti accoppiare e occorre prendere precauzioni in tal senso. Il giorno di gestazione (GG) 0 è quello in cui si osserva un tappo vaginale e/o la presenza di sperma. Quando si acquistano da un fornitore femmine gravide di cui è nota l'età gestazionale, si deve prevedere un periodo adeguato di acclimatazione (ad esempio, 2-3 giorni). Le femmine fecondate sono assegnate a caso ai gruppi di controllo e di trattamento in modo da risultare, nella misura del possibile, in egual numero in ciascun gruppo (ad esempio, per ottenere una distribuzione uniforme, si raccomanda di utilizzare una procedura casuale stratificata, come quella basata sul peso corporeo). Anche il numero di femmine fecondate dallo stesso maschio deve essere uniforme nei vari gruppi.

**Numero e sesso degli animali**

11. In ciascun gruppo di trattamento e di controllo il numero di femmine gravide da esporre alla sostanza in esame deve essere sufficiente a garantire che i discendenti siano in numero adeguato a valutare la neurotossicità. Si raccomandano 20 nidiatae per ciascun livello di dose. È possibile utilizzare modelli di somministrazione delle dosi con repliche e a gruppi scaglionati se si raggiunge il numero totale previsto di nidiatae per gruppo e se si utilizzano modelli statistici adatti a tenere conto delle repliche.
12. Al più tardi il quarto giorno dalla nascita (PND 4, il giorno del parto corrisponde a PND 0) occorre regolare le dimensioni delle nidiatae eliminando in modo aleatorio i piccoli in eccesso, in modo da portare tutte le nidiatae a numero uguale (23), avendo cura che ciascuna di esse non superi la dimensione media della nidiata per il ceppo di roditori utilizzato (8-12). Ogni nidiata deve contenere, nella misura del possibile, lo stesso numero di maschi e femmine. Non è ammessa l'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio, in base al peso corporeo. Dopo la standardizzazione delle nidiatae (mediante eliminazione dei piccoli soprannumerari) e prima di analizzare gli endpoint funzionali, occorre identificare in modo univoco, con metodi non cruenti (cfr. nota 24), ogni piccolo che si prevede di sottoporre a prove pre o post svezzamento.

**Assegnazione degli animali alle prove funzionali e comportamentali, alla determinazione del peso del cervello e alla valutazione neuropatologica**

13. Il presente metodo di prova consente di scegliere in vari modi gli animali esposti in utero e via allattamento da destinare alle prove funzionali e comportamentali, agli esami della maturazione sessuale, alla determinazione del peso del cervello e alla valutazione neuropatologica (25). È possibile aggiungere altre prove sulla funzione neuro-comportamentale (ad esempio, il comportamento sociale), sulla neurochimica o sulla neuropatologia, valutando caso per caso e a condizione che non sia compromessa l'integrità delle prove originariamente richieste.
14. In ogni gruppo-dose si scelgono i piccoli da assegnare alle prove per l'esame degli endpoint a partire dal quarto giorno dopo la nascita (PND 4). La selezione dei piccoli deve essere effettuata in modo che, per quanto possibile, in tutte le prove siano egualmente rappresentati entrambi i sessi di ciascuna nidiata in ciascun gruppo-dose. Nella prova dell'attività motoria si deve esaminare la stessa coppia di maschi e femmine in tutte le fasce di età anteriori allo svezzamento (cfr. punto 35). Per tutte le altre prove, si può destinare alle varie prove comportamentali la stessa coppia o coppie diverse. È talvolta necessario destinare piccoli diversi alle prove della funzione cognitiva in cui si mettono a confronto animali appena svezzati e adulti, per evitare di confondere nelle misurazioni gli effetti dovuti all'età e quelli riconducibili all'esperienza acquisita (26)(27). Al momento dello svezzamento (PND 21), i piccoli che non sono selezionati per le prove possono essere sacrificati con metodi non cruenti. Le eventuali modifiche dell'assegnazione dei piccoli devono essere indicate nella relazione. L'unità statistica di misura è la nidiata (o la madre) e non il figlio.
15. Vi sono diversi modi per assegnare i piccoli agli esami pre e post svezzamento, alle prove cognitive, agli esami patologici ecc. (cfr. figura 1 per lo schema generale e appendice 1 per alcuni esempi di assegnazione). Di seguito è indicato il numero minimo consigliato di animali in ciascun gruppo-dose per gli esami pre e post svezzamento:

Osservazioni cliniche e peso corporeo	Tutti gli animali
Osservazioni cliniche dettagliate	20/sesso (1/sesso/nidiata)
Peso del cervello (post fissazione) PND 11-22	10/sesso (1/nidiata)
Peso del cervello (non fissato) ~ PND 70	10/sesso (1/nidiata)
Neuropatologia (fissazione per immersione o perfusione) PND 11-22	10/sesso (1/nidiata)
Neuropatologia (fissazione per perfusione) PND ~70	10/sesso (1/nidiata)

Maturazione sessuale	20/sexo (1/sexo/nidiata)
Altri indicatori di sviluppo (facoltativo)	Tutti gli animali
Ontogenesi comportamentale	20/sexo (1/sexo/nidiata)
Attività motoria	20/sexo (1/sexo/nidiata)
Funzione motoria e sensoriale	20/sexo (1/sexo/nidiata)
Apprendimento e memoria	10/sexo <sup>(a)</sup> (1/nidiata)

(<sup>a</sup>) Secondo la sensibilità delle prove della funzione cognitiva, può essere necessario esaminare un numero maggiore di animali, ad esempio, 1 maschio e 1 femmina per nidiata (per l'assegnazione degli animali alle prove, si veda l'appendice 1). Per ulteriori indicazioni sulle dimensioni del campione, si veda il documento d'orientamento dell'OCSE 43 (8).

## Dosaggio

16. Si utilizzano almeno tre diversi livelli di dose e un controllo parallelo. La somministrazione dei vari livelli di dose deve essere distanziata in modo che gli effetti tossici siano gradualmente. A meno che non vi siano limiti imposti dalla natura fisico-chimica o dalle proprietà biologiche della sostanza chimica in esame, si sceglie come dose più elevata il livello che induce un certo grado di tossicità nella madre (che si manifesta, ad esempio, in segni clinici, rallentamento dell'aumento del peso — non superiore al 10 % — e/o segnali evidenti di tossicità dose-limitante in un organo bersaglio). La dose più elevata non deve essere superiore a 1 000 mg per kg di peso corporeo al giorno, con qualche eccezione, ad esempio, nel caso in cui l'esposizione umana prevista alla sostanza in esame indichi la necessità di utilizzare una dose maggiore. In alternativa, è possibile determinare il dosaggio massimo da utilizzare per ottenere una tossicità minima nella madre mediante studi pilota o studi preliminari di definizione del range di dosi. Se la sostanza chimica in esame si è dimostrata tossica per lo sviluppo in uno studio standard di tossicità per lo sviluppo o in uno studio pilota, il livello più elevato dovrà essere la dose massima priva di effetti tossici eccessivi nella progenie — né morte in utero o neonatale, né malformazioni — che precluderebbero una valutazione significativa della neurotossicità. Il livello di dose minimo deve mirare a non produrre alcun segno di tossicità, in particolare di neurotossicità, nella madre o nella fase dello sviluppo. Occorre selezionare una sequenza decrescente di livelli di dose al fine di evidenziare eventuali relazioni dose-effetto e stabilire il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi (NOAEL), oppure le dosi prossime al limite di rivelabilità che consentano di determinare una dose di riferimento. L'intervallo ottimale tra dosi consecutive è definito da un fattore compreso fra due e quattro; spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo sperimentale per evitare intervalli molto ampi (ad esempio, di un fattore di oltre il 10).
17. I livelli di dose vanno selezionati tenendo conto degli eventuali dati esistenti sulla tossicità, oltre alle informazioni sul metabolismo e sulla tossicocinetica della sostanza in esame o di materiali ad essa correlate. Tali dati possono contribuire altresì a dimostrare l'adeguatezza dello schema di somministrazione delle dosi. La somministrazione diretta delle dosi ai piccoli va ponderata in funzione delle informazioni relative all'esposizione e ai dati farmacocinetici (28)(29). Prima di condurre studi che prevedono la somministrazione diretta a cuccioli occorre valutarne attentamente i pro e i contro (30).
18. Il gruppo di controllo parallelo deve essere trattato con un placebo oppure, se si utilizza un mezzo disperdente per somministrare la sostanza in esame, trattato col solo mezzo disperdente. A tutti gli animali deve di norma essere somministrato lo stesso volume di sostanza o di mezzo disperdente in base al peso corporeo. In caso venga utilizzato un mezzo disperdente o un altro additivo per facilitare la somministrazione delle dosi, occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del mezzo disperdente o dell'additivo: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza chimica in esame, effetti sulle sue proprietà chimiche che possono alterarne le caratteristiche tossiche ed effetti sul consumo di cibo o acqua oppure sullo stato nutrizionale degli animali. Il mezzo disperdente non deve causare effetti che possono interferire con l'interpretazione dello studio, non essere tossico dal punto di vista del neurocomportamento, né incidere sulla riproduzione o sullo sviluppo. Per quanto riguarda i nuovi veicoli, oltre al gruppo di controllo trattato con il solo mezzo disperdente, è necessario includere un gruppo di controllo trattato con un placebo. Gli animali del o dei gruppi di controllo devono essere manipolati esattamente come quelli dei gruppi esposti alla sostanza in esame.

## Somministrazione delle dosi

19. La via di esposizione attraverso cui somministrare la sostanza chimica in esame o il mezzo disperdente è scelta in funzione della potenziale via d'esposizione umana e in base alle informazioni disponibili sul metabolismo e sulla distribuzione negli animali sperimentali. La via di somministrazione è in genere orale (ad esempio, mediante una sonda gastrica, la dieta o l'acqua da bere), ma sono ammesse anche altre vie (ad esempio, cutanea o per inalazione), in base alle caratteristiche e alle vie di esposizione umana note o prevedibili [per ulteriori informazioni, si veda il documento di orientamento 43 (8)]. È necessario giustificare la scelta della via di somministrazione. La sostanza in esame va somministrata ogni giorno all'incirca alla stessa ora.
20. Di norma la dose somministrata ai singoli animali si calcola in base all'ultima determinazione del peso corporeo individuale. Occorre tuttavia regolare con grande attenzione le dosi durante l'ultimo trimestre di gravidanza. Le madri in cui si dovessero osservare effetti di eccessiva tossicità vanno sopresse con metodi non cruenti.
21. La sostanza in esame o il mezzo disperdente sono somministrati alle femmine fecondate almeno una volta al giorno, dal momento dell'impianto (GD 6) fino a tutto il periodo della lattazione (PND 21), affinché i figli siano esposti alla sostanza durante lo sviluppo neurologico pre e postnatale. L'età alla quale iniziare a somministrare le dosi, così come la durata e la frequenza della somministrazione, possono essere modificate se emergono elementi comprovanti che un altro disegno sperimentale corrisponde meglio all'esposizione umana. Se si utilizzano altre specie occorre regolare la durata della somministrazione per garantire un'esposizione durante tutti i periodi iniziali di sviluppo del cervello (vale a dire, equivalenti alla crescita prenatale e postnatale iniziale del cervello umano). La somministrazione può cominciare all'inizio della gestazione (GD 0), sebbene sia opportuno tener conto del fatto che la sostanza in esame può provocare la perdita dell'embrione prima dell'impianto. Questo rischio può essere evitato iniziando la somministrazione al sesto giorno (GD 6), scelta che però esclude dal trattamento le fasi di sviluppo comprese tra il GD 0 e 6. Quando il laboratorio acquista animali già fecondati, è impossibile iniziare il trattamento il GD 0, nel qual caso il GD 6 è una buona soluzione per la scelta del giorno di inizio della somministrazione. Il laboratorio decide lo schema di somministrazione delle dosi in base alle informazioni di cui dispone sugli effetti della sostanza in esame, alla propria esperienza e a considerazioni di tipo logistico, che possono anche portare a prolungare la somministrazione fin dopo lo svezzamento. È necessario interrompere la somministrazione il giorno del parto nelle femmine che non hanno ancora dato alla luce tutti i figli. In genere si ritiene che la progenie sia esposta attraverso il latte materno; si deve, tuttavia, considerare l'esposizione diretta dei piccoli se non è comprovata la loro esposizione continua. Prove dell'esposizione continua possono essere ricavate da, ad esempio, informazioni farmacocinetiche, tossicità nella progenie oppure modifiche dei biomarcatori (28).

## OSSERVAZIONI

### Osservazioni sulle madri

22. Tutte le madri sono accuratamente esaminate almeno una volta al giorno per verificare le condizioni di salute, comprese la morbilità e la mortalità.
23. Durante i periodi di trattamento e di osservazione si devono effettuare periodicamente esami clinici più approfonditi (almeno due volte nel periodo di somministrazione durante la gestazione e due volte nel periodo di somministrazione durante la lattazione), utilizzando almeno dieci madri per ogni livello di dose. L'osservazione è eseguita, fuori dalla gabbia di stabulazione, da tecnici specializzati che non conoscono il trattamento cui sono sottoposti gli animali e applicano protocolli standard per ridurre al minimo lo stress degli animali, limitare il più possibile il condizionamento dell'osservatore e massimizzare l'attendibilità tra osservatori. Ove possibile, è preferibile che le osservazioni in un determinato studio siano effettuate dallo stesso tecnico.
24. I segni osservati devono essere riportati nella relazione, specificandone anche l'entità, ogniqualvolta sia possibile. Tra le osservazioni cliniche devono rientrare tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi e delle mucose, la comparsa di secrezioni e l'attività autonoma (ad esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito e/o respirazione attraverso la bocca, anomalie nella minzione o nella defecazione).
25. Deve essere indicata nella relazione anche ogni risposta inusuale riguardante la posizione del corpo, il livello di attività (ad esempio maggiore o minore esplorazione della zona standard) e la coordinazione dei movimenti. Devono essere inoltre registrate le modificazioni dell'andatura (ad esempio andatura anserina, atassia), della postura (ad esempio gobba) e della reattività alla manipolazione, al posizionamento o ad altri stimoli ambientali, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, convulsioni o tremori, stereotipie (ad esempio toelettatura eccessiva, movimenti inusuali della testa, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (ad esempio tendenza a mordere o tendenza eccessiva a leccarsi, automutilazione, marcia a ritroso, vocalizzazione) o aggressivi.

26. I segni di tossicità vanno indicati nella relazione, insieme al giorno della loro insorgenza, ora del giorno, grado e durata.
27. Gli animali sono pesati al momento della somministrazione delle dosi almeno una volta alla settimana durante tutto lo studio, il giorno del parto o in prossimità di tale giorno e il giorno dello svezzamento (PND 21). Negli studi con sonda gastrica le madri sono pesate almeno con cadenza bisettimanale. Le dosi devono essere eventualmente regolate al momento di ogni pesata. Il consumo di cibo va misurato almeno con cadenza settimanale durante la gestazione e la lattazione. Il consumo di acqua va misurato almeno con cadenza settimanale se gli animali sono esposti alla sostanza in esame attraverso l'acqua.

### Osservazioni sulla progenie

28. Tutta la progenie è esaminata accuratamente almeno una volta al giorno per rilevare i segni di tossicità e determinare la morbilità e la mortalità.
29. Durante i periodi di trattamento e di osservazione si devono effettuare esami clinici più approfonditi. L'osservazione della progenie (almeno un piccolo/sexo/nidiata) è eseguita da tecnici specializzati che non conoscono il trattamento cui sono sottoposti gli animali e applicano protocolli standard per ridurre al minimo il condizionamento dell'osservatore e massimizzare l'attendibilità tra osservatori. Ove possibile, è preferibile che le osservazioni siano effettuate dallo stesso tecnico. Si controllano almeno gli effetti descritti nei paragrafi 24 e 25, applicabili alla fase di sviluppo in osservazione.
30. Tutti i segni di tossicità vanno indicati nella relazione, insieme al giorno della loro insorgenza, ora del giorno, grado e durata.

### Indicatori fisici e dello sviluppo

31. I cambiamenti degli indicatori dello sviluppo prima dello svezzamento (quali il dispiegamento del padiglione auricolare, l'apertura degli occhi, l'eruzione degli incisivi) sono strettamente correlati al peso corporeo (30)(31), che può pertanto costituire il miglior indicatore dello sviluppo fisico. La misurazione degli indicatori di sviluppo è consigliabile quindi solo quando è comprovata l'utilità di tali dati. Il calendario per la verifica di questi parametri è indicato nella tabella 1. In funzione degli effetti previsti e dei risultati delle misurazioni iniziali, può essere consigliabile aggiungere altre date o effettuare le misurazioni in altre fasi dello sviluppo.
32. Quando si esamina lo sviluppo fisico è preferibile riferirsi all'età postcoitale anziché a quella postnatale (33). Se la progenie è sottoposta a prova il giorno dello svezzamento, si raccomanda di eseguire la prova prima dello svezzamento vero e proprio, per evitare che lo stress associato a questo evento falsi la lettura degli effetti. Inoltre, gli esami della progenie da realizzarsi dopo lo svezzamento non si devono effettuare nei due giorni immediatamente successivi.

Tabella 1

### Calendario per l'esame degli indicatori fisici e dello sviluppo, e degli endpoint funzionali/comportamentali <sup>(a)</sup>

Endpoint	Età	Pre svezzamento <sup>(b)</sup>	Adolescenza <sup>(b)</sup>	Giovani adulti <sup>(b)</sup>
<b>Indicatori fisici e dello sviluppo</b>				
Peso corporeo e osservazioni cliniche		Settimanalmente <sup>(c)</sup>	almeno ogni due settimane	almeno ogni due settimane
Peso del cervello		PND 22 <sup>(d)</sup>		alla fine
Neuropatologia		PND 22 <sup>(d)</sup>		alla fine
Maturazione sessuale		—	se opportuno	—
Altri indicatori dello sviluppo <sup>(e)</sup>		se opportuno	—	—

Endpoint	Età	Pre svezzamento <sup>(b)</sup>	Adolescenza <sup>(b)</sup>	Giovani adulti <sup>(b)</sup>
<b>Endpoint funzionali/comportamentali</b>				
Ontogenesi comportamentale		almeno due misurazioni		
Attività motoria (incluso l'adattamento)		1-3 volte <sup>(f)</sup>	—	una volta
Funzione motoria e sensoriale		—	una volta	una volta
Apprendimento e memoria		—	una volta	una volta

(<sup>a</sup>) Questa tabella indica il numero minimo di misurazioni da eseguire. In funzione degli effetti previsti e dei risultati delle misurazioni iniziali, può essere consigliabile aggiungere altre date (ad esempio, animali vecchi) o effettuare le misurazioni in altre fasi dello sviluppo.

(<sup>b</sup>) Si raccomanda di sospendere le prove sulla progenie nei due giorni successivi allo svezzamento (cfr. paragrafo 23). Date consigliate per le prove sugli adolescenti: PND 25 ± 2, per l'apprendimento e la memoria; PND 25 ± 2 per la funzione motoria e sensoriale. Date consigliate per le prove sui giovani adulti: PND 60-70.

(<sup>c</sup>) Il peso corporeo deve essere misurato almeno due volte alla settimana quando la sostanza chimica è somministrata direttamente ai piccoli, in modo da regolare le dosi in base al rapido aumento ponderale che caratterizza questa fase.

(<sup>d</sup>) Se necessario, la pesatura del cervello e l'esame della neuropatologia possono essere effettuati prima (ad esempio, PND 11) (cfr. paragrafo 39).

(<sup>e</sup>) Occorre riportare nella relazione le misurazioni degli altri indicatori dello sviluppo eventualmente considerati oltre al peso corporeo (ad esempio, l'apertura degli occhi) (cfr. paragrafo 31).

(<sup>f</sup>) Cfr. paragrafo 35.

33. Si procede alla conta e all'identificazione del sesso dei piccoli vivi, quest'ultima effettuata tramite esame visivo o misurazione della distanza anogenitale (34)(35); ogni piccolo è pesato individualmente alla nascita o immediatamente dopo, almeno una volta alla settimana durante l'allattamento e successivamente almeno una volta ogni due settimane. Per valutare la maturazione sessuale, si determina l'età e il peso corporeo di almeno un maschio e una femmina per lettiera quando si osserva la comparsa dell'apertura vaginale (36) o della separazione prepuziale (37).

### Ontogenesi comportamentale

34. L'ontogenesi di determinati comportamenti è misurata in almeno un piccolo/sesso/lettiera nel periodo corrispondente all'età prescelta, utilizzando gli stessi piccoli in tutte le date stabilite per le misurazioni e per tutti i comportamenti esaminati. I giorni in cui si effettuano le misurazioni devono essere separati da intervalli regolari per definire se il cambiamento dell'ontogenesi di un determinato comportamento è normale oppure è legato al trattamento (38). Tra i comportamenti di cui si può esaminare l'ontogenesi indichiamo, a titolo di esempio, il riflesso di raddrizzamento, la geotassia negativa e l'attività motoria (38)(39)(40).

### Attività motoria

35. L'attività motoria deve essere monitorata (41)(42)(43)(44)(45) nel periodo che precede lo svezzamento e nell'età adulta. Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. La durata della sessione di prova deve essere tale da consentire di dimostrare l'adattamento intra-sessione dei controlli non trattati. È vivamente raccomandato di usare l'attività motoria per esaminare l'ontogenesi comportamentale. In una prova di ontogenesi comportamentale, gli animali utilizzati nelle sessioni di prova prima dello svezzamento devono essere sempre gli stessi. La frequenza delle prove deve essere tale da consentire di esaminare l'ontogenesi dell'adattamento intra-sessione (44). A tale scopo, fino al giorno dello svezzamento incluso, possono essere necessarie tre o più sessioni di prova (ad esempio, PND 13, 17, 21). Si devono poi esaminare gli stessi animali, o altri componenti della stessa nidiata, anche in età adulta verso la fine dello studio (ad esempio, PND 60-70). Se necessario, è possibile aggiungere sessioni di prova in altre date. L'attività motoria va controllata tramite un apparecchio di registrazione automatica, in grado di rilevarne sia l'aumento che la diminuzione (ciò vuol dire che il livello dell'attività di partenza misurata dall'apparecchio non deve essere così basso da escludere la possibilità di rilevarne la diminuzione, né così alto da impedire di rilevarne l'aumento). Tutti gli apparecchi vengono testati secondo protocolli standard per assicurare, nella misura del possibile, l'affidabilità inter-apparecchio e inter-sessione. I diversi gruppi di trattamento devono essere assegnati ai vari apparecchi nel modo più equilibrato possibile. Ogni animale è

sottoposto a prova separatamente. I gruppi di trattamento vanno ripartiti sull'arco della giornata per tener conto dei ritmi circadiani di attività. Si cercherà in particolar modo di ridurre al minimo le variazioni delle condizioni sperimentali assicurandosi che non avvengano sistematicamente durante la somministrazione della sostanza. Tra le variabili che possono influire su molte misurazioni del comportamento, ivi compresa l'attività motoria, vi sono il livello sonoro, le dimensioni e la forma della gabbia, la temperatura, l'umidità relativa, l'illuminazione, gli odori, l'uso della gabbia di stabulazione o di una nuova gabbia e le distrazioni legate all'ambiente.

### **Funzione motoria e sensoriale**

36. La funzione motoria e sensoriale deve essere esaminata accuratamente almeno una volta negli animali adolescenti e una volta nei giovani adulti (ad esempio, PND 60-70). Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. Il numero di prove condotte deve essere sufficiente a garantire un campionamento quantitativo adeguato delle modalità sensoriali (ad esempio, somato-sensoriale, vestibolare) e delle funzioni motorie (ad esempio, forza, coordinamento). Alcuni esempi di prove per valutare la funzione motoria e sensoriale: riflesso di spinta estensorio (46), riflesso di raddrizzamento (47)(48), calo del riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) e potenziali evocati (55).

### **Prove di apprendimento e memoria**

37. Una prova di apprendimento associativo e di memoria deve essere condotta dopo lo svezzamento (ad esempio,  $25 \pm 2$  giorni) e nei giovani adulti (PND 60 e oltre). Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. È possibile utilizzare le stesse prove o prove diverse per queste due fasi dello sviluppo. La scelta della o delle prove di apprendimento e memoria nei ratti svezzati e negli adulti è relativamente libera, purché si rispettino due criteri: in primo luogo, l'apprendimento deve essere esaminato osservando il cambiamento che avviene nel corso di ripetute prove o sessioni, oppure, per le prove che comportano un'unica sessione, con riferimento ad una condizione sperimentale che controlla gli effetti non associativi dell'esperienza di apprendimento; in secondo luogo, la o le prove devono includere una misurazione della memoria (a breve o lungo termine), oltre all'apprendimento iniziale (acquisizione), misurazione che però non può essere indicata nella relazione se non è accompagnata dalla misurazione dell'acquisizione ottenuta nella stessa prova. Se la o le prove di apprendimento e memoria dimostrano un effetto della sostanza chimica in esame, si può considerare il ricorso ad altre prove per escludere qualsiasi interpretazione fondata sulle alterazioni delle capacità sensoriali, motivazionali e/o motorie. Oltre a questi due criteri, si raccomanda che la scelta della prova di apprendimento e memoria si basi sulla comprovata sensibilità alla classe di sostanze chimiche in esame, sempre che tale informazione sia ricavabile dalla letteratura. Se non lo fosse, tra le prove che soddisfano i criteri summenzionati rientrano le seguenti: evitamento passivo (43)(56)(57), memoria spaziale associata al riconoscimento della posizione (Delayed-Matching-To-Position) per il ratto adulto (58) e per il neonato (59), condizionamento olfattivo (43)(60), labirinto acquatico di Morris (61)(62)(63), labirinto di Biel o Cincinnati (64)(65), labirinto a bracci radiali (66), labirinto a T (43), e acquisizione e ritenzione di un comportamento programmato (26)(67)(68). Altre prove descritte in letteratura si applicano ai ratti svezzati (26)(27) e agli adulti (19)(20).

### **Esame autoptico**

38. Le madri possono essere sottoposte a eutanasia dopo lo svezzamento della progenie.
39. La valutazione neuropatologica della progenie è eseguita sui tessuti degli animali soppressi con metodi non cruenti al ventiduesimo giorno dalla nascita (PND 22) o prima, in un giorno compreso tra PND 11 e PND 22, e al termine dello studio. I tessuti da esaminare negli animali sacrificati fino al PND 22 sono quelli cerebrali, mentre negli animali sacrificati alla fine sono sia i tessuti del sistema nervoso centrale (Snc) sia quelli del sistema nervoso periferico (SNP). Gli animali sacrificati il PND 22 o prima possono essere fissati per immersione o perfusione. Gli animali sacrificati al termine dello studio sono fissati per perfusione. Tutti gli aspetti della preparazione dei campioni tissutali, dalla perfusione degli animali alla dissezione dei campioni di tessuto, al trattamento dei tessuti, alla colorazione dei vetrini, devono seguire un modello sperimentale equilibrato, in cui ciascun lotto contiene una quantità di campioni rappresentativi di ogni gruppo-dose. Informazioni supplementari sulla neuropatologia si trovano nel documento di orientamento dell'OCSE n. 20 (9), e anche in (103).

### **Trattamento dei campioni di tessuto**

40. Si registrano tutte le anomalie macroscopiche osservate al momento dell'autopsia. I campioni di tessuto prelevati devono essere rappresentativi di tutte le regioni principali del sistema nervoso. Vanno conservati in un fissativo adatto e trattati in base a protocolli istologici standard pubblicati (69)(70)(71)(103). L'inclusione in paraffina per i tessuti del sistema nervoso centrale e di quello periferico è indicata, ma l'uso di osmio nella post fissazione oppure l'inclusione in una resina sintetica possono risultare mezzi più adatti quando è richiesto un grado più alto di risoluzione (ad esempio, per nervi periferici, qualora si sospetti una neuropatia periferica, e/o per l'analisi



morfometrica dei nervi periferici). I tessuti cerebrali prelevati ai fini dell'analisi morfometrica devono essere inclusi in un mezzo adatto, simultaneamente per tutti i livelli di dose, per evitare la coartazione, artefatto che può insorgere durante la conservazione prolungata nel fissativo (6).

### Esame neuropatologico

41. Le finalità dell'esame qualitativo sono le seguenti:

- i) individuare le regioni del sistema nervoso che presentano segni inequivocabili di alterazioni neuropatologiche,
- ii) individuare i tipi di alterazioni neuropatologiche derivanti dall'esposizione alla sostanza chimica in esame; e
- iii) determinare la gravità delle alterazioni neuropatologiche.

La ricerca delle alterazioni neuropatologiche è effettuata da un patologo debitamente formato mediante esame al microscopio di sezioni istologiche rappresentative dei campioni di tessuto. Ogni alterazione deve essere classificata assegnandole un livello di gravità soggettivo. Una colorazione con ematossilina ed eosina spesso è sufficiente per esaminare le sezioni cerebrali degli animali sacrificati il PND 22 o prima. Tuttavia, per le sezioni dei tessuti del sistema nervoso centrale e periferico prelevati da animali sacrificati al termine dello studio è raccomandata una colorazione per l'evidenziazione della mielina (ad esempio, luxol fast blu o cresil violetto) e un'impregnazione argentea (ad esempio, metodi di Bielschowsky o di Bodian). Spetta al patologo, in base alla propria esperienza e alla natura delle alterazioni osservate, decidere se utilizzare altre colorazioni per individuare e caratterizzare tipi di alterazioni particolari [ad esempio, proteina acida fibrillare della glia o istochimica della lectina per verificare le alterazioni gliali e microgliali (72), fluoro-jade per rilevare le necrosi (73) (74) o impregnazioni argentiche specifiche per le degenerazioni neurali (75)].

42. È utile eseguire una valutazione morfometrica (quantitativa), poiché i dati che se ne ricavano possono servire a rilevare un effetto causato dal trattamento e ad interpretare le differenze di peso o morfologia del cervello ascrivibili al trattamento (76)(77). Si prelevano campioni di tessuto nervoso e li si prepara per la valutazione morfometrica, che può consistere, ad esempio, in misurazioni lineari e della superficie di determinate regioni del cervello (78). Entrambe queste misurazioni si praticano su sezioni omologhe attentamente selezionate in base a indicatori microscopici affidabili (6). Il ricorso alla stereologia è utile per identificare gli effetti del trattamento su parametri quali il volume o il numero di cellule di determinate regioni neuroanatomiche (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. L'esame cerebrale è teso a individuare qualsiasi segno manifesto di alterazioni neuropatologiche dovute al trattamento, su campioni prelevati all'uopo da tutte le principali regioni cerebrali (ad esempio, bulbi olfattivi, corteccia cerebrale, ippocampo, gangli basali, talamo, ipotalamo, mesencefalo — tetto, tegmento e peduncoli cerebrali —, ponte, midollo allungato, cervelletto), in modo da garantire un esame il più completo possibile. È importante che le sezioni siano prelevate nello stesso piano in tutti gli animali. Negli adulti sottoposti ad eutanasia al termine dello studio si prelevano sezioni rappresentative del midollo spinale e del sistema nervoso periferico. Le zone esaminate devono comprendere l'occhio, con il nervo ottico e la retina, il midollo spinale a livello del rigonfiamento lombare e di quello cervicale, le fibre della radice dorsale e ventrale, il nervo sciatico prossimale, il nervo tibiale prossimale (a livello del ginocchio) e la ramificazione del nervo tibiale a livello dei muscoli del polpaccio. Per il midollo spinale e il nervo periferico, le sezioni devono essere sia trasversali che longitudinali.

44. La valutazione neuropatologica deve includere la ricerca di segni di danni a carico del sistema nervoso (6)(85)(86)(87)(88)(89), come pure di alterazioni cellulari (quali vacuolizzazione neuronale, degenerazioni, necrosi) e modificazioni tissutali (quali gliosi, infiltrazione leucocitaria, formazione di cisti). A questo proposito, è importante distinguere gli effetti dovuti al trattamento dagli eventi normali dello sviluppo che notoriamente avvengono nella fase corrispondente all'età dell'animale al momento del sacrificio (90). Di seguito si elencano, a titolo illustrativo, alcune alterazioni significative che sono indice di danno verificatosi nel corso dello sviluppo:

- alterazioni delle dimensioni macroscopiche o della forma dei bulbi olfattivi, del cervello o del cervelletto,
- alterazioni delle dimensioni relative di varie regioni del cervello, in particolare aumento o diminuzione dovuti alla perdita o alla persistenza di popolazioni normalmente transitorie di cellule o a proiezioni assionali (ad esempio, strato germinativo esterno del cervelletto, corpo calloso),
- alterazioni della proliferazione, migrazione e differenziazione, rivelate da zone di apoptosi o necrosi eccessiva, popolazioni raggruppate o disperse di neuroni mal orientati o malformati oppure alterazioni delle dimensioni relative di vari strati delle strutture corticali,

- alterazioni dei modelli di mielinizzazione, in particolare la riduzione delle dimensioni complessive delle strutture mielinate o modifica della loro colorazione,
- segni manifesti di idrocefalia, in particolare ingrossamento dei ventricoli, stenosi dell'acquedotto di Silvio e assottigliamento degli emisferi cerebrali.

### **Analisi della relazione tra le alterazioni neuropatologiche e la dose**

45. Il seguente protocollo è raccomandato per le analisi neuropatologiche qualitative e quantitative. Si inizia col mettere a confronto le sezioni del gruppo trattato con la dose elevata e quelle del gruppo di controllo. Se non si riscontrano alterazioni neuropatologiche negli animali del gruppo trattato con la dose elevata, non occorre effettuare ulteriori analisi. In caso contrario, si procede all'esame degli animali trattati con le dosi intermedie e basse. Se lo studio sul gruppo trattato con la dose elevata è interrotto a causa del decesso degli animali o di effetti tossici di diversa natura non associati alla sostanza in esame, si ricercano allora alterazioni neuropatologiche nei gruppi trattati con le dosi intermedie e basse. Se si rilevano segni di neurotossicità nei gruppi trattati con le dosi più basse, occorre sottoporre questi gruppi all'analisi neuropatologica. Se dall'esame qualitativo e quantitativo risultano alterazioni neuropatologiche dovute al trattamento, occorre determinare in che misura l'incidenza, la frequenza e il livello di gravità delle lesioni o delle alterazioni morfometriche dipendono dalla dose (dose-dipendenza), in base alla valutazione di tutti gli animali di tutti i gruppi trattati. Tutte le regioni del cervello che presentano qualsiasi segno di alterazione neuropatologica devono essere incluse in questa valutazione. Occorre descrivere, per ciascun tipo di lesione, le caratteristiche su cui si basano i diversi livelli di gravità, indicando i criteri utilizzati per distinguerli. Si registra la frequenza e il livello di gravità di ciascun tipo di lesione e si effettua un'analisi statistica per valutare la natura della relazione dose-risposta. Si raccomanda l'uso di vetrini codificati (91).

#### DATI E RELAZIONE

##### **Dati**

46. I dati, riferiti separatamente e riassunti sotto forma di tabella, devono indicare per ogni singolo gruppo sperimentale i tipi di alterazioni e il numero delle madri, dei discendenti per sesso e delle nidiati che presentano ciascun tipo di alterazione. Se è stata eseguita un'esposizione diretta postnatale della progenie, occorre indicare la via, la durata e il periodo di esposizione.

##### **Analisi e interpretazione dei risultati**

47. L'obiettivo di uno studio della neurotossicità nella fase dello sviluppo è di fornire informazioni sugli effetti dell'esposizione ripetuta a una sostanza chimica durante lo sviluppo in utero e nella fase iniziale postnatale. Poiché lo studio evidenzia sia la tossicità generale che gli endpoint di tossicità per lo sviluppo, i risultati consentiranno di distinguere gli effetti sul neurosviluppo che si verificano in assenza di tossicità materna generale da quelli indotti solo da livelli che risultano tossici anche per le madri. La complessità delle interrelazioni tra il disegno sperimentale, l'analisi statistica e la significatività biologica dei dati esige che l'interpretazione dei dati sulla neurotossicità nella fase dello sviluppo sia avvalorata da un parere specialistico (107)(109). I risultati dello studio devono essere interpretati soppesandone la forza probante (20)(92)(93)(94). Si dovranno discutere gli eventuali tipi di effetti comportamentali o morfologici riscontrati, così come le prove della relazione dose-risposta. Questa caratterizzazione dovrà includere i dati di tutti gli studi di valutazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo, in particolare studi epidemiologici sull'uomo o rapporti di studi di casi e studi su animali sperimentali (ad esempio, dati tossicocinetici, informazioni sulla relazione struttura-attività, dati ottenuti da altri studi di tossicità). Dovrà inoltre essere stabilita la relazione tra le dosi della sostanza chimica in esame e la presenza, l'assenza, l'incidenza e la portata degli eventuali effetti neurotossici per ciascun sesso (20)(95).
48. L'analisi dei dati deve includere una discussione della significatività biologica e statistica. L'analisi statistica non deve determinare l'interpretazione, bensì fungere da strumento che serve a orientarla. L'assenza o la presenza di significatività statistica di per sé non vale a giustificare l'assenza o la presenza di effetti legati al trattamento. Per evitare eventuali falsi negativi e le difficoltà inerenti alla dimostrazione di un risultato negativo, occorre includere nella discussione dei risultati i dati storici di controllo e i dati di controllo positivi, soprattutto quando non si rileva alcun effetto ascrivibile al trattamento (102) (106). La probabilità di ottenere falsi positivi deve essere discussa alla luce dell'analisi statistica generale dei risultati (96). L'analisi deve comprendere l'eventuale relazione tra le alterazioni neuropatologiche e comportamentali osservate.

49. Tutti i risultati devono essere analizzati applicando modelli statistici adatti al disegno sperimentale (108). La scelta di un'analisi parametrica o non parametrica deve essere giustificata non solo tenendo conto di fattori quali la natura dei dati (trasformati e non) e la loro distribuzione, ma anche considerando la solidità relativa dell'analisi statistica utilizzata. L'analisi statistica deve essere scelta in base alla finalità dello studio e al suo disegno sperimentale, in modo da limitare il più possibile errori di tipo I (falsi positivi) e di tipo II (falsi negativi) (96)(97)(104)(105). Se lo studio dello sviluppo utilizza specie multipare nelle quali si sottopongono a prova svariati piccoli per nidata, il modello statistico deve tenere conto della nidata, per evitare un eccesso di errori di tipo I (98)(99)(100)(101). L'unità statistica di misura è la nidata e non il figlio e i modelli sperimentali devono essere concepiti in modo da escludere che piccoli della stessa nidata siano considerati osservazioni indipendenti. Qualsiasi endpoint misurato varie volte nello stesso soggetto deve essere analizzato mediante modelli statistici che tengano conto della non indipendenza di tali misure.

### **Relazione sulla prova**

50. La relazione deve comprendere i seguenti dati.

#### *Sostanza chimica in esame:*

- natura fisica e, ove pertinenti, proprietà fisico-chimiche;
- dati identificativi, compresa la provenienza;
- purezza del preparato e impurità note e/o attese.

#### *Mezzo disperdente (se del caso):*

- motivazione della scelta del mezzo disperdente, se diverso dall'acqua o da una soluzione salina fisiologica.

#### *Animali sperimentali:*

- specie e ceppo utilizzati, e giustificazione se la specie scelta è diversa dal ratto;
- fornitore degli animali sperimentali;
- numero, età all'inizio della prova e sesso degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, acqua ecc.;
- peso di ciascun animale all'inizio della prova.

#### *Condizioni sperimentali:*

- criteri di selezione dei livelli di dose;
- criteri di selezione della via e del periodo di somministrazione delle dosi;
- dosi somministrate, caratteristiche del mezzo disperdente, volume e forma fisica del preparato somministrato;
- informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/incorporazione nella dieta, sulla concentrazione finale, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;
- metodo utilizzato per l'identificazione univoca delle madri e della progenie;
- descrizione dettagliata del o dei protocolli di randomizzazione utilizzati per assegnare le madri ai gruppi di trattamento, per selezionare i piccoli da eliminare dalla nidata e per assegnare quelli restanti ai gruppi sperimentali;
- modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;
- se del caso, equivalenza tra la concentrazione della sostanza chimica nel cibo, nell'acqua o inalata, espressa in ppm, e la dose effettiva, espressa in mg/kg di peso corporeo/giorno;
- condizioni ambientali,
- dettagli sul tipo di cibo e acqua (acqua di rubinetto, distillata);
- date di inizio e fine dello studio.

*Protocolli di osservazione e protocolli sperimentali:*

- descrizione dettagliata dei protocolli utilizzati per standardizzare le osservazioni, accompagnata dalla descrizione dei protocolli e delle definizioni operative impiegati per classificare le osservazioni;
- elenco di tutti i protocolli sperimentali utilizzati e giustificazione della loro scelta;
- descrizione particolareggiata dei protocolli comportamentali/funzionali, patologici, neurochimici o elettrofisiologici utilizzati, comprese informazioni e dettagli sugli apparecchi automatici;
- protocolli di taratura e di garanzia dell'equivalenza degli apparecchi; protocolli utilizzati per garantire la composizione equilibrata dei gruppi sottoposti al trattamento;
- breve motivazione delle decisioni che si fondano sul giudizio professionale.

*Risultati (individuali e di sintesi, comprese la media e la varianza se del caso):*

- numero di animali all'inizio dello studio e numero al termine dello studio;
- numero di animali e nidiati utilizzati in ciascun metodo di prova;
- numero di identificazione di ciascun animale e nidiata di provenienza;
- dimensioni della nidiata e peso medio alla nascita per sesso;
- peso corporeo e variazioni del peso corporeo, compresi peso corporeo finale delle madri e dei figli;
- dati relativi al consumo di cibo e, se del caso, di acqua (ad esempio, se la sostanza chimica in esame viene somministrata con l'acqua);
- dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, in particolare i segni di tossicità o mortalità, specificando il momento e la causa del decesso, se del caso;
- natura, gravità, durata, giorno di esordio, ora del giorno e successivo decorso delle osservazioni cliniche dettagliate;
- punteggio di ogni indicatore di sviluppo (peso, maturazione sessuale e ontogenesi comportamentale) al momento di ciascuna osservazione;
- descrizione dettagliata di tutte le osservazioni comportamentali, funzionali, neuropatologiche, neurochimiche, elettrofisiologiche per sesso, compresi gli incrementi e i decrementi rispetto ai controlli;
- reperti autoptici,
- peso del cervello
- ogni diagnosi formulata alla luce di lesioni e segni neurologici, ivi comprese malattie o condizioni spontanee;
- immagini di reperti emblematici;
- immagini a debole ingrandimento che consentono di valutare l'omologia delle sezioni utilizzate per la morfometria;
- dati sull'assorbimento e sul metabolismo, compresi dati complementari provenienti da uno studio di tossicocinetica condotto separatamente, se disponibili;
- elaborazione statistica dei risultati, compresi i modelli statistici utilizzati per l'analisi dei dati, e i risultati, indipendentemente dal fatto che siano significativi;
- elenco delle persone che hanno partecipato allo studio, specificandone la formazione professionale.

*Discussione dei risultati:*

- informazioni sulla relazione dose-risposta, per sesso e gruppo;
- legame tra eventuali altri effetti tossici e le conclusioni circa il potenziale neurotossico della sostanza chimica in esame, per sesso e gruppo;

- ripercussioni delle eventuali informazioni tossicocinetiche sulle conclusioni;
- analogie tra gli effetti osservati e quelli di eventuali sostanze neurotossiche note;
- dati a sostegno dell'attendibilità e della sensibilità del metodo di prova (vale a dire, dati storici di controllo e dati di controllo positivi);
- eventuale rapporto tra gli effetti neuropatologici e funzionali;
- NOAEL o dose di riferimento per madri e prole, per sesso e gruppo.

*Conclusioni:*

- discussione sull'interpretazione generale dei dati basata sui risultati, che espliciti la conclusione a cui si è giunti, ossia se la sostanza chimica esaminata abbia causato o meno neurotossicità nella fase dello sviluppo, con relativo NOAEL.

**BIBLIOGRAFIA**

- (1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.
- (2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [[http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS\\_Harmonized/870\\_Health\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Series/](http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/)].
- (3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- (4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
- (5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
- (6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
- (7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.
- (8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008 Available: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- (9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Available: [[http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_1916054\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html)].
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

- (14) Capitolo B.34 del presente allegato, Saggio di tossicità sulla riproduzione: una generazione.
- (15) Capitolo B.35 del presente allegato, Studio di tossicità riproduttiva a due generazioni.
- (16) Capitolo B.43 del presente allegato, Studi di neurotossicità nei roditori.
- (17) Capitolo B.31 del presente allegato, Studio di tossicità prenatale.
- (18) Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (GU L 276 del 20.10.2010, pag. 33).
- (19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Available: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- (20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Available: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm>].
- (21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1<sup>st</sup> Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- (22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
- (23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
- (24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
- (25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
- (26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- (27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- (28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- (29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
- (30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
- (31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- (32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.
- (33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
- (34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
- (35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.

- (36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
- (37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
- (38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
- (39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- (40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pagg. 67-100.
- (41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
- (42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pagg. 37-82.
- (43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
- (44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
- (45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
- (46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
- (47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
- (48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
- (49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pagg. 287-351
- (50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
- (51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pagg. 181-211.
- (52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
- (53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25-30.
- (54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
- (55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pagg. 125-145.
- (56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.

- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.
- (59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
- (60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
- (61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
- (62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
- (63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev*, 36:60-90.
- (64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
- (65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
- (66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosourea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
- (67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
- (68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338-341.
- (69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
- (70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pagg. 84-107.
- (71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone, London.
- (72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
- (73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123-130.
- (74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.
- (75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.

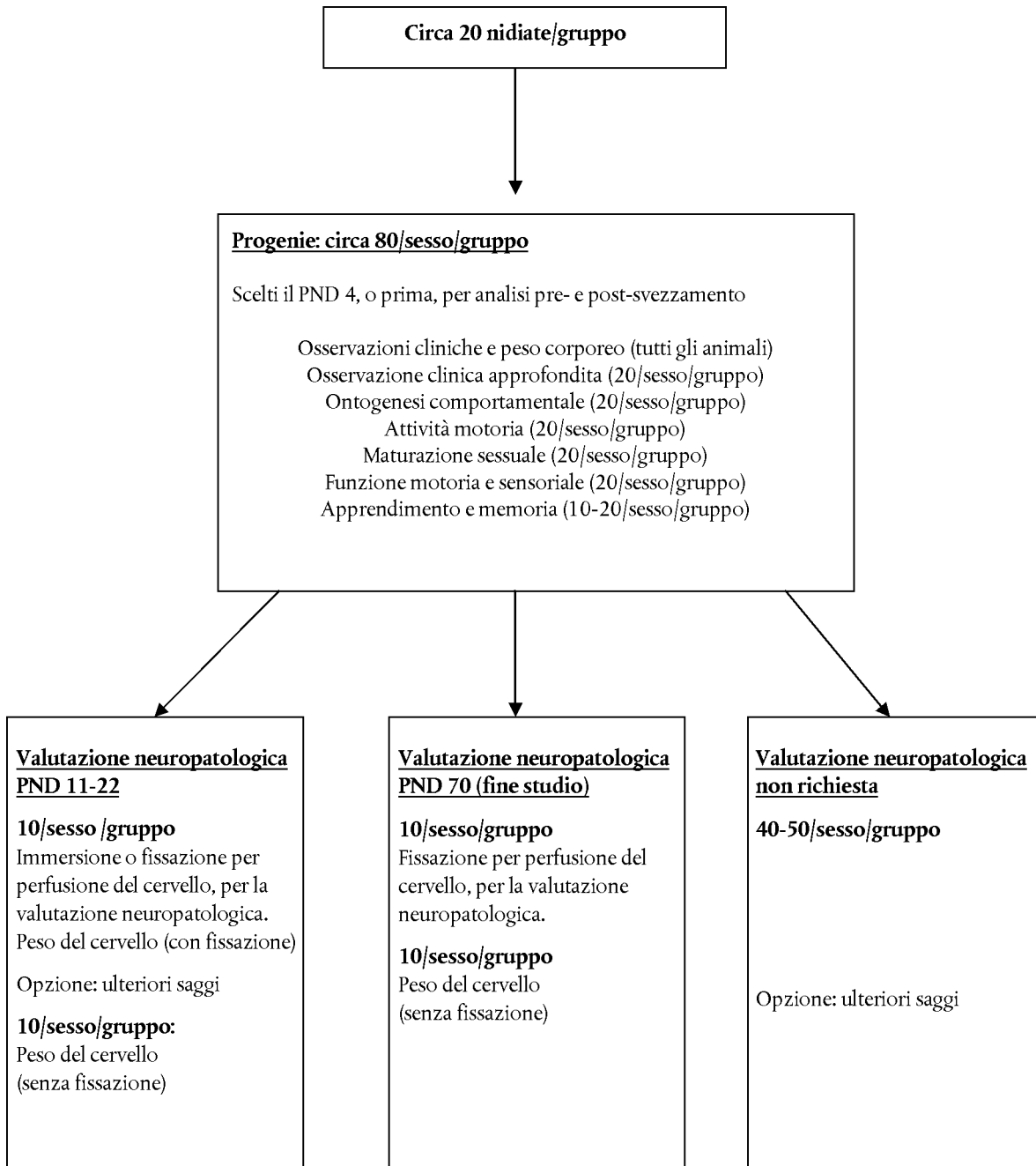


- (77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
- (78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
- (79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- (80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305-310.
- (81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262-268.
- (82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
- (83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
- (84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
- (85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113-121.
- (86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
- (87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pagg. 3-41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70-74.
- (89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056-1060.
- (90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- (91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Lett.*, 63:127-133.
- (92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
- (93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.
- (94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- (95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- (96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113-126.
- (97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.

- (98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
- (99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165-172.
- (100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221-228.
- (101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
- (102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
- (103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296-313.
- (104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
- (105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295-301.
- (106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.
- (107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288-325.
- (108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.
- (109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

Figura 1

Schema generale per le prove funzionali/comportamentali, la valutazione neuropatologica e la determinazione del peso cerebrale. Questo diagramma si basa sulla descrizione di cui ai paragrafi 13-15 (PND = giorno postnatale). Alcuni esempi di suddivisione degli animali sono illustrati nell'appendice 1.



## Appendice 1

1. Questa appendice contiene alcuni esempi di suddivisione degli animali, di cui si dà una descrizione e una sintesi sotto forma di tabella. Sono esempi che servono ad illustrare come l'assegnazione degli animali possa essere effettuata in vari modi nei diversi impianti sperimentali.

### Esempio 1

2. Si utilizzano 20 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per eseguire le prove pre svezzamento dell'ontogenesi comportamentale. Di questo gruppo, 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti il ventiduesimo giorno dopo la nascita (PND 22). Se ne prelevano i cervelli, che sono poi pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica. Si ricavano inoltre i dati ponderali dei cervelli non fissati dei restanti 10 maschi e 10 femmine per livello di dose.
3. Si utilizzano altri 20 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove funzionali/comportamentali post svezzamento (osservazioni cliniche dettagliate, attività motoria, riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro e prove della funzione cognitiva negli adolescenti) e per valutare l'età della maturazione sessuale. Di questi, 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.
4. Per le prove della funzione cognitiva nei giovani adulti (ad esempio, PND 60-70), si utilizzano ulteriori 20 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata). Di questi, 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati al termine dello studio per poi prelevare e pesare il cervello.
5. I restanti 20 animali/sexso/gruppo possono essere utilizzati per eventuali prove supplementari.

Tabella 1

N. animale <sup>(a)</sup>		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogenesi comportamentale
		10 m + 10 f	Peso cervello neuropatologia/morfometria al PND 22
		10 m + 10 f	Peso cervello al PND 22
2	6	20 m + 20 f	Osservazioni cliniche dettagliate
		20 m + 20 f	Attività motoria
		20 m + 20 f	Maturazione sessuale
		20 m + 20 f	Funzione motoria e sensoriale
		20 m + 20 f	Apprendimento e memoria (PND 25)
		10 m + 10 f	Peso cervello/neuropatologia/morfometria nei giovani adulti ~PND 70
3	7	20 m + 20 f	Apprendimento e memoria (giovani adulti)
		10 m + 10 f	Peso cervello nei giovani adulti ~ PND 70
4	8	—	Animali di riserva per sostituzioni o prove supplementari

<sup>(a)</sup> In questo esempio le nidiatae sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.

## Esempio 2

6. Si utilizzano 20 piccoli/sexso/livello di dose (ad esempio, 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per eseguire le prove pre svezzamento dell'ontogenesi comportamentale. Di questi, 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti l'undicesimo giorno dopo la nascita (PND 11). Se ne prelevano i cervelli, che sono poi pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica.
7. Si utilizzano 20 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove post svezzamento (osservazioni cliniche dettagliate, attività motoria, valutazione della maturazione sessuale e della funzione motoria e sensoriale). Di questi, 10 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato, pesato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.
8. Per le prove sulla funzione cognitiva negli adolescenti e nei giovani adulti si impiegano 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata). Animali diversi sono utilizzati per le prove sulla funzione cognitiva al PND 23 e allo stadio di giovani adulti. Al termine dello studio i 10 animali/sexso/gruppo sottoposti alle prove da adulti sono sacrificati e il cervello è prelevato e pesato.
9. I restanti 20 animali/sexso/gruppo non selezionati per le prove sono sacrificati ed eliminati al momento dello svezzamento.

Tabella 2

N. animale <sup>(a)</sup>		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Ontogenesi comportamentale Peso cervello/neuropatologia/morfometria al PND 11
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Osservazioni cliniche dettagliate Attività motoria Maturazione sessuale Funzione motoria e sensoriale Peso cervello/neuropatologia/morfometria nei giovani adulti ~PND 70
3	7	10 m + 10 f <sup>(b)</sup>	Apprendimento e memoria (PND 23)
3	7	10 m + 10 f <sup>(b)</sup>	Apprendimento e memoria (giovani adulti) Peso cervello nei giovani adulti
4	8	—	Animali sacrificati ed eliminati al PND 21

<sup>(a)</sup> In questo esempio le nidiatae sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.

<sup>(b)</sup> Piccoli diversi sono impiegati per le prove cognitive al PND 23 e allo stadio di giovani adulti (ad esempio, piccoli in soprannumero nelle nidiatae rispetto ai 20 prestabiliti).

## Esempio 3

10. Si utilizzano 20 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per determinare il peso del cervello e la neuropatologia all'undicesimo giorno (PND 11). Di questi, 10 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti il PND 11 e i cervelli sono prelevati, pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica. Si ricavano inoltre i dati ponderali dei cervelli non fissati dei restanti 10 maschi e 10 femmine per livello di dose.

11. Si utilizzano altri 20 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove di ontogenesi comportamentale (attività motoria), gli esami post svezzamento (attività motoria e valutazione dell'età della maturazione sessuale), e le prove della funzione cognitiva negli adolescenti.
12. Si utilizzano altri 20 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove sulla funzione motoria e sensoriale (riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro) e per osservazioni cliniche dettagliate. Di questi, 10 animali/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato, pesato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.
13. Si utilizzano ulteriori 20 piccoli/sexso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove della funzione cognitiva nei giovani adulti. Di questi, 10 animali/sexso/gruppo (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati al termine dello studio per poi prelevare e pesare il cervello.

Tabella 3

N. animale <sup>(a)</sup>		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	10 m + 10 f 10 m + 10 f	Peso cervello/neuropatologia/morfometria al PND 11 Peso cervello al PND 11
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f	Ontogenesi comportamentale (attività motoria) Attività motoria Maturazione sessuale Apprendimento e memoria (PND 27)
3	7	20 m + 20 f  20 m + 20 f 10 m + 10 f	Riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro (adolescenti e giovani adulti) Osservazioni cliniche dettagliate Peso cervello/neuropatologia/morfometria nei giovani adulti ~PND 70
4	8	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Apprendimento e memoria (giovani adulti) Peso cervello nei giovani adulti

<sup>(a)</sup> In questo esempio le nidiata sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.

**Definizioni**

Sostanza chimica: sostanza o miscela

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

---