

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 440 (2007). Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario per rivedere le linee guida esistenti ed elaborarne di nuove per lo screening e le prove delle sostanze considerate interferenti endocrini potenziali (1). Tra gli elementi su cui si sono concentrati i lavori figura la messa a punto di una linea guida per il saggio uterotrofico sui roditori. La linea guida è stata poi oggetto di un vasto programma di validazione, che ha incluso la compilazione di un documento di riferimento dettagliato (2)(3) e la realizzazione di intensi studi intra e interlaboratorio, volti a dimostrare la pertinenza e la riproducibilità del saggio eseguito con un potente estrogeno di riferimento, con agonisti deboli dei recettori per gli estrogeni, con un antagonista forte dei recettori per gli estrogeni e con una sostanza chimica di riferimento negativa (4)(5)(6)(7)(8)(9). Il presente metodo di prova B.54 è frutto dell'esperienza acquisita nel corso del programma di validazione e dei risultati ottenuti riguardo agli agonisti degli estrogeni.
2. Il saggio uterotrofico è una prova di screening a breve termine che risale agli anni 30 (27)(28) e che è stata standardizzata per la prima volta nel 1962 a fini di depistaggio da un comitato di esperti (32) (35). Basato sull'aumento del peso uterino, la cosiddetta risposta uterotrofica (cfr. 29), questo metodo valuta la capacità di una sostanza chimica di stimolare un'attività biologica analoga a quella degli agonisti o degli antagonisti degli estrogeni naturali (ad esempio, 17 $\beta$ -estradiolo), seppure il suo uso per la determinazione degli antagonisti sia molto meno frequente. L'utero risponde agli estrogeni in due modi: inizialmente con un aumento di peso dovuto all'assorbimento di acqua, cui segue un ulteriore aumento causato dalla crescita tissutale (30). La reazione dell'utero nei ratti e nei topi è qualitativamente comparabile.
3. Il presente saggio costituisce una prova di screening in vivo e la sua applicazione deve essere considerata nel contesto del "Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino" (appendice 2). In questo quadro concettuale, il saggio uterotrofico si colloca nel livello 3 come saggio in vivo che fornisce dati riguardo ad un unico meccanismo endocrino, ovvero l'attività estrogenica.
4. Il saggio uterotrofico è destinato a far parte di una batteria di prove in vitro e in vivo volta ad individuare le sostanze chimiche potenzialmente in grado di interagire con il sistema endocrino, e consentire di valutarne i rischi per la salute umana o per l'ambiente. Nel programma di validazione dell'OCSE sono stati utilizzati agonisti degli estrogeni sia forti che deboli per valutare l'efficacia del metodo nell'individuare le sostanze chimiche estrogeniche (4)(5)(6)(7)(8). È stata quindi dimostrata la sensibilità del protocollo sperimentale agli agonisti degli estrogeni, così come la sua buona riproducibilità intra e interlaboratorio.
5. Per quanto riguarda le sostanze chimiche negative, nel programma di validazione è stata inclusa solo una sostanza chimica di riferimento "negativa" già identificata come tale dal saggio uterotrofico e da saggi in vitro dei recettori e del legame con recettori, ma sono stati valutati dati sperimentali supplementari, esterni al programma di validazione OCSE, che hanno confermato la specificità del saggio uterotrofico per lo screening degli agonisti degli estrogeni (16).

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

6. Gli agonisti e gli antagonisti degli estrogeni fungono da ligandi dei recettori estrogenici a e b e possono, rispettivamente, attivare o inibire l'azione trascrizionale dei recettori. Dato che ciò può incidere negativamente sulla salute, in particolare sulla riproduzione e sullo sviluppo, è necessario poter esaminare e valutare rapidamente l'eventuale azione agonista o antagonista degli estrogeni esplicita dalle sostanze chimiche. Sebbene apportino informazioni utili, l'affinità di un ligando per un recettore estrogenico oppure l'attivazione della trascrizione di geni reporter in vitro non sono gli unici fattori che determinano un possibile pericolo. Altri determinanti possono essere l'attivazione e la disattivazione metabolica dopo l'ingresso della sostanza chimica nell'organismo, la sua distribuzione nei tessuti bersaglio e l'eliminazione dall'organismo, che dipendono, almeno in parte, dalla via di somministrazione e dalla sostanza stessa. Occorre pertanto indagare l'eventuale attività di una sostanza chimica in vivo, in condizioni idonee, a meno che le sue caratteristiche relative all'assorbimento, alla distribuzione, al metabolismo e all'eliminazione (ADME) non forniscano già le informazioni necessarie. I tessuti dell'utero rispondono con una crescita rapida e vigorosa alla stimolazione con estrogeni, in particolare nei roditori da laboratorio, il cui ciclo estrale ha una durata di circa 4 giorni. I roditori, in particolare il ratto, sono ampiamente utilizzati anche negli studi di tossicità per la caratterizzazione dei pericoli. L'utero dei roditori è pertanto un organo bersaglio adatto per lo screening in vivo degli agonisti e degli antagonisti degli estrogeni.
7. Il presente metodo di prova si basa sui protocolli impiegati nello studio di validazione dell'OCSE che si sono dimostrati affidabili e ripetibili negli studi intra e interlaboratorio (5)(7). Attualmente sono praticabili due metodi: l'uno che utilizza femmine adulte ovariectomizzate e l'altro che utilizza femmine immature non ovariectomizzate. Nel programma di validazione delle prove dell'OCSE si è visto che entrambi i metodi possiedono sensibilità e

riproducibilità analoghe. Tuttavia, il metodo con femmine immature, il cui asse ipotalamo-ipofisario-ovarico (HPG) è intatto, è forse meno specifico ma copre un campo di investigazione più vasto rispetto al metodo che utilizza animali ovariectomizzati, perché è sensibile alle sostanze chimiche che interagiscono con l'asse HPG e non soltanto a quelle che interagiscono con i recettori degli estrogeni. Nel ratto l'asse HPG è funzionale a partire circa dal 15° giorno successivo alla nascita. Prima di questa fase, la pubertà non può essere accelerata, somministrando, ad esempio, GnRH. Con l'approssimarsi della pubertà, prima dell'apertura vaginale, la femmina avrà diversi cicli silenti, senza apertura vaginale o ovulazione ma con alcune fluttuazioni ormonali. Se una sostanza chimica stimola direttamente o indirettamente l'asse HPG, si avrà pubertà precoce, ovulazione precoce e apertura vaginale accelerata. L'accelerazione della crescita e dell'apertura vaginale è stimolata non solo dalle sostanze chimiche che agiscono sull'asse HPG, ma anche da alcuni regimi alimentari con livelli di energia metabolizzabile più alti della norma senza essere estrogenici. Queste sostanze non inducono una risposta uterotrofica nelle femmine adulte ovariectomizzate perché il loro asse HPG non funziona.

8. In un'ottica di attenzione al benessere degli animali, il metodo da preferirsi è quello che utilizza ratti immaturi, evitando in tal modo il pretrattamento chirurgico e il rischio di non poter utilizzare gli animali che manifestano segni di pre-estro (cfr. paragrafo 30).
9. La risposta uterotrofica non è esclusivamente di origine estrogenica, ma può essere stimolata anche da sostanze chimiche diverse dagli agonisti o dagli antagonisti degli estrogeni. Ad esempio, dosi relativamente elevate di progesterone e testosterone o di varie progestine sintetiche possono anch'esse indurre una stimolazione (30). Qualsiasi risposta può essere oggetto di un esame istologico volto a rilevare tessuti vaginali cheratinizzati e corneificati (30). A prescindere dalla possibile origine della risposta, l'esito positivo di un saggio uterotrofico deve di norma essere seguito da ricerche più approfondite. L'attività estrogenica può essere confermata da prove in vitro, come i saggi di legame ai recettori estrogenici e i saggi di attivazione della trascrizione, o da altri saggi in vivo come quello della pubertà nelle femmine.
10. Fermo restando che il saggio uterotrofico costituisce una prova di screening in vivo, il metodo adottato per la sua convalida ha tenuto conto del benessere degli animali e si configura come una strategia di prove in sequenza. A tal fine, i lavori sono stati diretti principalmente a convalidare con rigore la riproducibilità e la sensibilità del depistaggio dell'attività estrogenica (il problema maggiore posto da molte sostanze chimiche), mentre solo alcuni sono stati dedicati alla componente antiestrogenica della prova. È stato testato un solo potente antiestrogeno, poiché il numero di sostanze chimiche dotate di un chiaro profilo antiestrogenico (non confuso da una qualche attività estrogenica) è molto limitato. Il presente metodo di prova è quindi destinato al protocollo estrogenico, mentre il protocollo che descrive il modo antagonista della prova è illustrato in un documento di orientamento (37). Per quanto riguarda le sostanze chimiche che esplicano un'attività esclusivamente antiestrogenica, la riproducibilità e la sensibilità del saggio saranno definite più chiaramente in un secondo tempo, quando il protocollo sperimentale sarà ormai divenuto di routine e dopo che sarà stato identificato un maggior numero di sostanze chimiche aventi tale modo di azione.
11. Tutti i protocolli che prevedono l'uso di animali rispetteranno le norme locali in materia di benessere animale; la descrizione delle cure e del trattamento che figurano in appresso costituiscono norme minime alle quali si sostituiranno le regolamentazioni locali, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (38). Per ulteriori orientamenti relativi al trattamento degli animali nel rispetto delle norme etiche si veda la pubblicazione dell'OCSE di cui al riferimento bibliografico 25.
12. Come per tutte le prove che utilizzano animali vivi, prima di iniziare il saggio è fondamentale assicurarsi che i dati ricercati siano realmente necessari, come possono esserlo nei due casi seguenti:
  - potenziale di esposizione elevato (livello 1 del quadro concettuale, di cui all'appendice 2) oppure elementi indicanti attività estrogenica (livello 2) tali da giustificare la necessità di investigare se tali effetti si possono produrre in vivo;
  - effetti indicanti attività estrogenica nei livelli 4 o 5 delle prove in vivo, tali da giustificare la necessità di dimostrare il loro legame con un meccanismo estrogenico non evidenziabile con prove in vitro.
13. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

14. La sensibilità del saggio uterotrofico richiede un sistema sperimentale nel quale l'asse ipotalamo-ipofisario-ovarico dell'animale non sia funzionale, con conseguenti livelli minimi di estrogeni endogeni in circolazione; in tal modo si garantisce un peso uterino di partenza basso e un range massimo di risposta agli estrogeni somministrati. I roditori femmina soddisfano queste condizioni nei seguenti stati di sensibilità agli estrogeni:
- i) femmine immature, dopo lo svezzamento e prima della pubertà, e
  - ii) giovani adulte ovariectomizzate, trascorso il periodo necessario alla regressione dei tessuti uterini.
15. La sostanza chimica è somministrata ogni giorno tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Si somministrano dosi scalari ad almeno due gruppi di animali (precisazioni al paragrafo 33), esponendo ogni gruppo a un livello di dose. Il periodo di somministrazione è di tre giorni consecutivi nel metodo che utilizza le femmine immature e di almeno tre giorni consecutivi nel metodo con le femmine adulte ovariectomizzate. Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Per lo studio degli agonisti degli estrogeni, si confronta il peso uterino medio degli animali trattati con quello del gruppo di controllo che ha ricevuto solo il mezzo disperdente, per determinare se esiste un aumento statisticamente significativo. Nel presente saggio, un aumento statisticamente significativo del peso uterino medio di un gruppo sperimentale indica una risposta positiva.

## DESCRIZIONE DEL METODO

**Selezione delle specie animali**

16. Si possono utilizzare i ceppi di roditori di uso comune nei laboratori, ad esempio, i ceppi di ratti Sprague-Dawley e Wistar impiegati nella validazione. Non si dovranno utilizzare ceppi dei quali si sa o si sospetta che l'utero è meno reattivo. Il laboratorio deve dimostrare la sensibilità del ceppo utilizzato come descritto nei paragrafi 26 e 27.
17. L'uso del ratto e del topo come specie di routine per il saggio uterotrofico risale agli anni 30. Gli studi di validazione dell'OCSE sono stati effettuati unicamente sui ratti, partendo dal presupposto che le due specie siano equivalenti e che, per risparmiare risorse e animali, una sola specie sia sufficiente per la validazione a livello internazionale. Il ratto è la specie scelta nella maggior parte degli studi di tossicità per la riproduzione e nella fase dello sviluppo. Dato che esiste una ricca base di dati storici sul topo, per ampliare il campo di applicazione del saggio uterotrofico sui roditori e includere questa specie, è stato condotto un studio complementare di validazione, più circoscritto, sul topo (16). Si è scelto di adottare un approccio comparativo, con un numero limitato di sostanze chimiche esaminate, un numero minore di laboratori coinvolti e senza campioni codificati, in modo da rispettare l'intenzione iniziale di risparmiare risorse e animali. Questo studio comparativo di validazione ha mostrato che esiste una buona corrispondenza qualitativa e quantitativa tra i dati ottenuti nei saggi uterotrofici realizzati con femmine di topo giovani adulte ovariectomizzate e i dati ottenuti nei saggi analoghi con femmine di ratto. Quando i risultati del saggio uterotrofico si inseriscono in una fase preliminare di uno studio a lungo termine, è possibile utilizzare in entrambi gli studi animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza. L'approccio comparativo è stato applicato solo per le prove con la femmina di topo ovariectomizzata e la relativa relazione non contiene un insieme di dati abbastanza solido da convalidare il modello che utilizza femmine immature, ragion per cui tale modello non rientra nel campo di applicazione del presente metodo di prova.
18. È quindi comprovato che, in alcuni casi, è possibile utilizzare il topo invece del ratto. Questa scelta dovrà essere giustificata da dati tossicologici, farmacocinetici e/o di altra natura e potrà comportare la necessità di modificare il protocollo. Ad esempio, il consumo alimentare del topo rispetto al suo peso corporeo è più elevato di quello del ratto, per cui la quantità di fitoestrogeni contenuta negli alimenti dovrà essere inferiore (9)(20)(22).

**Condizioni di stabulazione e alimentazione**

19. Tutte le procedure devono essere conformi agli standard locali in materia di cura degli animali sperimentali. Le cure e il trattamento qui descritti costituiscono norme minime alle quali si sostituiranno le regolamentazioni locali, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (38). 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 deve essere 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).
20. Gli animali ricevono alimentazione da laboratorio e acqua da bere a volontà. I giovani adulti possono essere alloggiati individualmente o in gruppi fino a tre animali. Data la giovane età, gli animali immaturi sono di preferenza alloggiati in gabbie collettive.

21. È noto che le diete da laboratorio contenenti livelli elevati di fitoestrogeni fanno aumentare il peso uterino nei roditori in misura sufficiente ad interferire con il saggio uterotrofico (13)(14)(15). Livelli elevati di fitoestrogeni e di energia metabolizzabile nelle diete da laboratorio possono anche indurre una pubertà precoce, se sono utilizzati animali immaturi. La presenza di fitoestrogeni dipende innanzitutto dall'inclusione di prodotti a base di soia e erba medica nelle diete da laboratorio e si è constatato che le concentrazioni di fitoestrogeni variano da un lotto di alimenti all'altro (23). Il peso corporeo è una variabile importante, dato che è in stretta relazione con la quantità di alimenti assunti. Pertanto, la dose di fitoestrogeni effettivamente assunta con la stessa dieta può variare secondo la specie e l'età (9). Nei ratti, il consumo alimentare rispetto al peso corporeo della femmina immatura può essere circa doppio di quello della giovane adulta ovariectomizzata, mentre nei topi questo rapporto arriva ad essere quadruplo.
22. I risultati del saggio uterotrofico (9)(17)(18)(19), tuttavia, indicano che, se presenti nella dieta in deboli quantità, i fitoestrogeni non riducono la sensibilità della prova e sono quindi ammessi. A titolo indicativo, le quantità di fitoestrogeni negli alimenti non devono superare 350 µg di equivalente genisteina/grammo di miscela per laboratorio per le femmine immature di ratto Sprague Dawley e Wistar (6)(9). Questa dieta dovrebbe essere adatta anche per le prove sulle giovani adulte ovariectomizzate, le quali, in proporzione al peso corporeo, consumano meno cibo rispetto agli animali immaturi. Se si devono utilizzare femmine di topo adulte ovariectomizzate oppure femmine di ratto più sensibili ai fitoestrogeni, occorrerà ridurre proporzionalmente i livelli di fitoestrogeni nella dieta (20). Un altro fattore da considerare è che l'energia metabolizzabile disponibile varia da una dieta all'altra, e tale differenza può tradursi in uno sfasamento dell'inizio della pubertà (21)(22).
23. Prima di cominciare lo studio occorre scegliere attentamente una dieta povera in fitoestrogeni [per maggiori indicazioni, cfr. (6)(9)] o in energia metabolizzabile, per evitare di falsare i risultati (15)(17)(19)(22)(36). Per tenere sotto controllo questi due fattori è importante garantire il buon funzionamento del sistema sperimentale utilizzato dal laboratorio seguendo quanto indicato ai paragrafi 26 e 27. Come misura di precauzione, in conformità alle buone prassi di laboratorio (BPL), si preleva un campione rappresentativo di ciascun lotto di alimenti somministrati durante lo studio per ricercarvi eventualmente la presenza di fitoestrogeni (ad esempio, in caso di peso uterino elevato negli animali di controllo rispetto ai dati storici, oppure in caso di risposta inadeguata all'estrogeno di riferimento, 17- $\alpha$ -etinilestradiolo). Le aliquote sono analizzate nell'ambito dello studio, congelate a - 20 °C, oppure conservate in modo da evitare che il campione si decomponga prima dell'analisi.
24. Alcuni tipi di lettiera possono contenere sostanze estrogeniche o antiestrogeniche naturali (ad esempio, si sa che il tutolo influisce sulla ciclicità nelle femmine di ratto e potrebbe avere effetti antiestrogenici). Il tipo di lettiera scelto dovrà contenere un livello minimo di fitoestrogeni.

### **Preparazione degli animali**

25. Gli animali sperimentali, scelti dopo aver verificato che non presentino segni di malattie né di anomalie fisiche, sono assegnati a caso ai gruppi di trattamento e di controllo. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali vanno identificati in modo univoco. Di preferenza, durante l'acclimatazione, gli animali immaturi sono messi in gabbia con le loro madri o con altre femmine che allattano fino allo svezzamento. Il periodo di acclimatazione prima dell'inizio dello studio è di circa 5 giorni per le giovani femmine adulte e per gli animali immaturi accompagnati dalle loro madri o da altre femmine. Se gli animali immaturi non sono accompagnati dalla madre e sono già svezzati, il periodo di acclimatazione dovrà essere necessariamente più corto, perché la somministrazione deve iniziare immediatamente dopo lo svezzamento (cfr. paragrafo 29).

### **PROTOCOLLO**

#### **Verifica della competenza del laboratorio**

26. La competenza del laboratorio può essere verificata in due modi:
  - mediante una verifica periodica, con riferimento a uno studio iniziale di controllo positivo (cfr. paragrafo 27). Almeno ogni 6 mesi e ogni volta che si verifica un cambiamento che può influire sull'esito della prova (ad esempio, una nuova formulazione della dieta, personale diverso che esegue le dissezioni, cambio di ceppo o di fornitore ecc.), occorre verificare la sensibilità del sistema sperimentale (modello animale) a una dose congrua (stabilita in base allo studio iniziale di controllo positivo di cui al paragrafo 27) dell'estrogeno di riferimento, ossia il 17 $\alpha$ -etinilestradiolo (n. CAS 57-63-6) (EE);
  - mediante il concomitante allestimento di gruppi di controllo, includendo in ciascuna prova un gruppo che riceve una dose congrua dell'estrogeno di riferimento.

Se il sistema non risponde come previsto, occorre rivedere le condizioni sperimentali e modificarle di conseguenza. In entrambi i casi la dose raccomandata dell'estrogeno di riferimento corrisponde circa a DE 70-80 (DE: dose efficace).

27. **Studio iniziale di controllo positivo** — Prima di eseguire uno studio applicando per la prima volta il presente metodo di prova, il laboratorio deve dimostrare la propria competenza determinando la risposta del modello animale ad almeno quattro dosi dell'estrogeno di riferimento, il 17 $\alpha$ -etinilestradiolo (n. CAS 57-63-6). L'effetto sul peso uterino sarà confrontato con i dati storici consolidati [cfr. riferimento (5)]. Se questo studio iniziale non dà l'esito previsto, le condizioni sperimentali devono essere esaminate e modificate.

### **Numero e condizione degli animali**

28. Ciascun gruppo trattato e di controllo è composto di almeno 6 animali, sia nel protocollo con femmine immature sia in quello con adulte ovariectomizzate.

### **Età degli animali immaturi**

29. Per il saggio uterotrofico con animali immaturi è necessario indicare il giorno di nascita. La somministrazione deve iniziare con sufficiente anticipo per far sì che, alla fine del periodo di somministrazione, non si sia ancora verificato l'aumento fisiologico degli estrogeni endogeni connesso con la pubertà. D'altro canto, è stato constatato che gli animali molto giovani possono essere meno reattivi. Per definire l'età ottimale, ogni laboratorio deve basarsi sui propri dati di riferimento sulla maturazione sessuale.

In linea di massima, la somministrazione delle dosi nei ratti può iniziare subito dopo uno svezzamento precoce, il 18° giorno dopo la nascita (PND 18, tenuto conto che il giorno della nascita corrisponde al giorno 0), e terminare, di preferenza, il PND 21, e comunque prima del PND 25: a partire da questa età l'asse ipotalamo-ipofisario-ovarico dell'animale diviene funzionale e il livello di estrogeni può cominciare ad innalzarsi, con il concomitante aumento sia del peso uterino medio di riferimento sia della deviazione standard dei gruppi (2)(3)(10)(11)(12).

### **Ovariectomia**

30. L'ovariectomia delle femmine di ratto e topo dei gruppi di trattamento e di controllo è praticata tra la sesta e l'ottava settimana di età. Il tempo che deve trascorrere tra l'operazione e la prima somministrazione affinché l'utero ritorni a un peso minimo di riferimento e si stabilizzi è di almeno 14 giorni nel ratto e almeno 7 giorni nel topo. Poiché basta una piccola quantità di tessuto ovarico per produrre livelli significativi di estrogeni circolanti (3), gli animali devono essere controllati prima della prova, osservando le cellule epiteliali prelevate mediante striscio vaginale per almeno cinque giorni consecutivi (ad esempio, dal 10° al 14° giorno dopo l'ovariectomia nel ratto). Gli animali che presentano segni di pre-estro non devono essere utilizzati. Inoltre, al momento dell'autopsia, occorre esaminare i peduncoli ovarici per determinare se resta del tessuto ovarico, nel qual caso, i dati relativi all'animale non devono essere presi in considerazione nei calcoli (3).
31. L'ovariectomia è praticata sull'animale disteso sul ventre, opportunamente anestetizzato. Si incide la zona dorso-laterale della parete addominale con un taglio di circa 1 cm nel punto intermedio tra il bordo costale inferiore e la cresta iliaca, a qualche millimetro dal margine laterale del muscolo lombare. Si asportano le ovaie dalla cavità addominale, le si deposita su campo sterile e si recidono a livello della giunzione dell'ovidotto e del corpo dell'utero. Dopo aver escluso la presenza di emorragia importante, si sutura la parete addominale e si richiude la pelle con clip o sutura idonea. I punti di legatura sono indicati schematicamente nella figura 1. Sarà poi praticata un'analgesia postoperatoria adeguata, raccomandata da un veterinario specializzato in roditori.

### **Peso corporeo**

32. Nel metodo che utilizza femmine adulte ovariectomizzate, il peso corporeo e il peso dell'utero non sono correlati, perché quest'ultimo è influenzato da ormoni come gli estrogeni, ma non dai fattori di crescita che regolano la corporatura. Il peso corporeo è invece connesso al peso uterino negli animali immaturi, durante il periodo di maturazione (34). Pertanto, all'inizio dello studio con animali immaturi, la variazione di peso tra gli animali deve

essere minima e non superare  $\pm 20\%$  del peso medio. Ciò significa che le dimensioni della nidiate devono essere standardizzate dall'allevatore, per garantire che la progenie di madri diverse sia nutrita più o meno allo stesso modo. Gli animali sono assegnati ai gruppi (di controllo e di trattamento) in maniera aleatoria, in modo che non vi sia alcuna differenza statistica tra il peso corporeo medio dei vari gruppi. Conviene evitare nella misura del possibile di destinare animali della stessa nidiate allo stesso gruppo di trattamento, senza però che ciò comporti un aumento del numero di nidiate necessarie allo studio.

### **Dosaggio**

33. Per stabilire se una sostanza chimica può avere un'azione estrogenica in vivo, in genere è sufficiente allestire due gruppi-dose e un gruppo di controllo: è questo il disegno sperimentale da preferirsi per motivi dettati dal benessere degli animali. Se lo scopo è ottenere una curva della relazione dose-risposta o estrapolare i risultati per applicarli a dosi più basse, sono necessari almeno 3 gruppi-dose. Se si desidera ottenere informazioni più particolareggiate sull'attività estrogenica (ad esempio, una stima dell'efficacia) occorre prevedere un altro schema di dosaggio. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico a quelli dei gruppi che ricevono il trattamento. Se per somministrare la sostanza in esame si utilizza un mezzo disperdente, il gruppo di controllo riceverà la stessa quantità di mezzo disperdente usato per i gruppi trattati (o la quantità massima utilizzata se questa varia da gruppo a gruppo).
34. L'obiettivo, nel caso del saggio uterotrofico, è di scegliere delle dosi che garantiscano la sopravvivenza degli animali e non inducano tossicità né distress significativi dopo tre giorni consecutivi di somministrazione della sostanza chimica, fino a una dose massima quotidiana di 1 000 mg/kg. Tutti i livelli di dose devono essere proposti e scelti tenendo conto degli eventuali dati esistenti sulla tossicità e sulla (tossico)cinetica della sostanza in esame o di sostanze affini. Il livello di dose più elevato deve essere stabilito innanzitutto in base alla DL50 e/o alle informazioni sulla tossicità acuta, onde evitare il decesso, sofferenze gravi o distress degli animali (24)(25)(26). La dose più elevata deve costituire la dose massima tollerata (MTD); è anche possibile basarsi su uno studio effettuato utilizzando un livello di dose che abbia indotto una risposta uterotrofica positiva. Per uno screening, è possibile in genere distanziare di molto i livelli di dose (ad esempio, a intervalli di mezza unità logaritmica, ossia a un fattore di progressione di 3,2 o persino 1 unità logaritmica). In mancanza di dati al riguardo, si può svolgere uno studio volto ad identificare il range di dosi utilizzabili.
35. In alternativa, se l'efficacia estrogenica di un agonista può essere stimata mediante dati in vitro (o in silico), questi possono essere presi in considerazione per la scelta delle dosi. Ad esempio, la quantità di sostanza chimica in esame che produrrà risposte uterotrofiche equivalenti a quelle dell'agonista di riferimento (etinilestradiolo) è stimata tramite la corrispettiva efficacia in vitro rispetto a quella dell'etinilestradiolo. La dose sperimentale massima si ottiene moltiplicando questa dose equivalente per un fattore adeguato, ad esempio 10 o 100.

### **Determinazione del range di dosi**

36. Se necessario, è possibile effettuare uno studio preliminare con pochi animali per individuare il range di dosi. A tale riguardo, può essere utile consultare il documento di orientamento dell'OCSE n. 19 (25), che definisce i segni clinici di tossicità o distress negli animali. Se tale studio preliminare lo consente, dopo tre giorni di trattamento gli uteri possono essere escissi e pesati a circa 24 ore dall'ultima dose. I dati ricavati possono poi essere utilizzati per mettere a punto lo studio principale (individuare la dose massima e minima accettabili e raccomandare il numero di gruppi-dose).

### **Somministrazione delle dosi**

37. La sostanza chimica è somministrata tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Quando si sceglie la via di somministrazione occorre tener conto sia del benessere degli animali sia di vari aspetti tossicologici, quali l'attinenza con la via di esposizione umana alla sostanza chimica (sonda orogastrica per un'esposizione tramite ingestione, iniezione sottocutanea per un'esposizione mediante inalazione o assorbimento cutaneo), le caratteristiche fisico-chimiche della sostanza in esame e soprattutto le informazioni tossicologiche e i dati metabolici e cinetici (ad esempio, la necessità di evitare il metabolismo di primo passaggio, una migliore efficacia di una determinata via di somministrazione).
38. Si raccomanda di considerare in primo luogo, ogniqualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa. Dato però che i ligandi degli estrogeni o i loro precursori metabolici tendono ad essere idrofobi, è più comune utilizzare una soluzione/sospensione oleosa (ad esempio, olio di mais, di arachidi, di sesamo o d'oliva). Tuttavia, poiché questi oli non hanno lo stesso valore calorico, né lo stesso tenore in grassi, il mezzo disperdente può influire sull'apporto complessivo di energia metabolizzabile, alterando di conseguenza gli endpoint misurati, quali il peso uterino, soprattutto nel metodo che impiega gli animali immaturi (33). Pertanto, prima di iniziare lo studio, il mezzo disperdente prescelto deve essere testato con riferimento ai controlli senza mezzo disperdente. Le

sostanze in esame possono essere disciolte in una quantità minima di etanolo 95 % o di altri solventi idonei, poi diluite nel mezzo disperdente prescelto alle concentrazioni finali desiderate. Le caratteristiche tossiche del solvente devono essere note e testate su un gruppo di controllo a parte trattato unicamente con il solvente. Se la sostanza in esame è considerata stabile, se ne può favorire la solubilizzazione riscaldandola leggermente e sottoponendola ad una azione meccanica vigorosa. È necessario determinare la stabilità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente. Se la sostanza in esame rimane stabile per tutta la durata dello studio, se ne prepara inizialmente un'aliquota, dopodiché giorno per giorno si preparano le diluizioni necessarie.

39. Il calendario per la somministrazione dipende dal modello animale utilizzato (cfr. paragrafo 29 per le femmine immature e il paragrafo 30 per le femmine ovariectomizzate). Nel caso delle femmine di ratto immature, la sostanza in esame è somministrata quotidianamente per tre giorni consecutivi. Un trattamento della durata di tre giorni è raccomandato anche per le femmine di ratto ovariectomizzate, le quali possono però essere esposte anche per periodi più lunghi, favorendo in tal modo la ricerca di sostanze ad azione più debole. Per le femmine di topo ovariectomizzate, tre giorni di trattamento sono di norma sufficienti per individuare gli agonisti estrogenici potenti, senza che vi siano vantaggi significativi a prolungare questo periodo fino a sette giorni, mentre per gli estrogeni deboli lo studio di validazione non ha comprovato tale relazione (16), pertanto la durata della somministrazione deve essere protratta fino a sette giorni consecutivi. La dose va somministrata ogni giorno all'incirca alla stessa ora e regolata in modo da mantenere un livello costante rispetto al peso corporeo degli animali (ad esempio, mg di sostanza in esame per kg di peso corporeo al giorno). Si deve ridurre al minimo la variabilità del volume in esame rispetto al peso corporeo, adeguando le concentrazioni in modo che, in proporzione al peso corporeo, il volume somministrato sia lo stesso per tutti i livelli di dose e per tutte le vie di somministrazione.
40. La somministrazione forzata deve effettuarsi in dose unica giornaliera, mediante sonda gastrica o cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale e dalle linee guida locali sulla cura degli animali, ma in ogni caso non deve essere superiore a 5 ml/kg di peso corporeo, salvo nel caso di soluzioni acquose, delle quali se ne possono somministrare 10 ml/kg di peso corporeo.
41. Se la sostanza in esame è iniettata per via sottocutanea, la somministrazione si effettua in dose unica giornaliera. Le iniezioni sono effettuate nella regione dorsoscapolare o lombare con ago sterile (di calibro 23 o 25) e una siringa da insulina. La rasatura del sito di iniezione è facoltativa. Le eventuali perdite e fuoriuscite di liquido al momento dell'iniezione o una somministrazione incompleta devono essere indicate nella relazione. Il volume complessivo per ratto per giorno non supera 5 ml/kg di peso corporeo, suddiviso in due siti di iniezione, tranne nel caso delle soluzioni acquose, delle quali si possono utilizzare 10 ml/kg di peso corporeo.

## **Osservazioni**

### *Osservazioni generali e cliniche*

42. Almeno una volta al giorno si esegue un'osservazione clinica generale, con più frequenza se si constatano segni di tossicità. Le osservazioni sono effettuate di preferenza ogni giorno alla stessa ora e tenendo conto del momento in cui si prevede che gli effetti siano più accentuati dopo la somministrazione delle dosi. Tutti gli animali sono osservati per controllare la mortalità, la morbilità e i segni clinici generali quali alterazioni del comportamento, della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, comparsa di secrezioni ed escrezioni e l'attività autonoma (ad esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, alterazioni della respirazione).

### *Peso corporeo e consumo alimentare*

43. Tutti gli animali sono pesati quotidianamente (peso espresso in grammi, arrotondato al primo decimale), a partire da appena prima di avviare il trattamento, ossia al momento dell'assegnazione degli animali ai gruppi. Si può scegliere di misurare anche la quantità di cibo consumata durante il periodo del trattamento in ogni gabbia, pesando i contenitori di cibo. I dati sul consumo alimentare sono espressi in grammi per ratto al giorno.

### *Dissezione e pesatura dell'utero*

44. Ventiquattro ore dopo l'ultimo trattamento, i ratti sono soppressi con metodi non cruenti. Idealmente, l'ordine nel quale i gruppi di animali sono sottoposti ad autopsia è aleatorio e non segue l'ordine crescente o decrescente delle dosi, perché ciò potrebbe influire leggermente sui dati. L'obiettivo del saggio è di misurare il peso umido e il peso secco degli uteri. Il peso umido è quello dell'utero e del fluido del lume. Il peso secco è quello misurato dopo la spremitura dell'utero e l'eliminazione del fluido.

45. Prima della dissezione si esamina la vagina delle femmine immature per osservarne lo stato di apertura. La dissezione inizia con l'apertura della parete addominale a livello della sinfisi pubica. Le corna uterine e le ovaie, se presenti, sono staccate dalla parete addominale dorsale. La vescica e gli ureteri sono separati dal lato ventrale e laterale dell'utero e della vagina. Il tessuto fibroso del setto retto-vaginale è scollato fino a individuare la giunzione dell'orifizio vaginale e della cute perineale. L'utero e la vagina sono staccati dal corpo incidendo la parete vaginale appena sopra la giunzione della cute perineale, come illustrato nella figura 2. L'utero è staccato dal corpo recidendo delicatamente il mesentere nel punto di attacco lungo tutta la componente dorso-laterale di ciascun corno uterino. Una volta estratto, l'utero deve essere manipolato con rapidità tale da evitare la disidratazione dei tessuti. La perdita di peso dovuta a disidratazione è più importante con tessuti di piccole dimensioni, come l'utero (23). Se presenti, le ovaie sono staccate a livello dell'ovidotto, procedendo in modo da evitare la perdita di fluido del lume dal corno uterino. Se l'animale è stato ovariectomizzato, i peduncoli sono esaminati per rilevare l'eventuale presenza di tessuto ovarico. Si eliminano il grasso in eccesso e il tessuto connettivo. La vagina è staccata dall'utero appena sotto la cervice, in modo che quest'ultima resti insieme al corpo dell'utero, come illustrato nella figura 2.
46. Ogni utero è trasferito in un recipiente tarato e recante un contrassegno univoco (ad esempio, una capsula Petri o una navicella per pesata in plastica), continuando a fare attenzione a che non si disidratino prima della pesata (si può collocare nel recipiente un pezzo di carta da filtro leggermente inumidito con soluzione salina). Si pesa l'utero e il fluido del lume (peso uterino umido, espresso in mg e arrotondato al primo decimale).
47. Ogni utero è poi trattato singolarmente per eliminare il fluido del lume. Si perforano le due corna uterine oppure le si taglia lungo l'asse longitudinale. Si deposita l'utero su un pezzo di carta da filtro leggermente inumidita (ad esempio, Whatman n. 3) e lo si comprime delicatamente con un secondo pezzo di carta da filtro, anch'esso leggermente inumidito, fino ad eliminare completamente il fluido del lume. Si pesa l'utero svuotato del suo contenuto del lume (peso uterino secco, espresso in mg arrotondato al primo decimale).
48. Il peso uterino a fine prova può servire per verificare che le femmine di ratto immature intatte non abbiano superato l'età appropriata, sebbene i dati storici del ceppo utilizzato dal laboratorio siano determinanti a questo riguardo (per l'interpretazione dei risultati, cfr. paragrafo 56).

#### *Studi facoltativi*

49. L'utero, dopo essere stato pesato, può essere messo in formalina tamponata al 10 % a pH neutro per essere sottoposto a esame istopatologico, previa colorazione con ematossilina ed eosina. Anche la vagina può essere esaminata (cfr. paragrafo 9). Si possono inoltre eseguire misurazioni morfometriche dell'epitelio endometriale a fini di raffronti quantitativi.

#### DATI E RELAZIONE

##### **Dati**

50. I dati devono comprendere:
  - numero degli animali all'inizio della prova,
  - numero e identità degli animali trovati morti durante la prova o soppressi a fini etici, nonché data e ora di ogni decesso naturale o indotto,
  - numero e identità degli animali che presentano segni di tossicità e descrizione dei segni di tossicità osservati, con indicazione di data e ora della loro comparsa, durata e gravità degli effetti tossici, e
  - numero e identità degli animali che presentano lesioni e descrizione del tipo di lesione.
51. Il peso corporeo, il peso uterino umido e il peso uterino secco sono informazioni da indicare nella relazione per ciascun animale. Per determinare se la somministrazione della sostanza in esame provoca un aumento statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) del peso uterino si ricorre ad analisi statistiche unilaterali per gli agonisti. Occorre effettuare analisi statistiche atte a determinare se il peso uterino secco e umido ha subito alterazioni dovute alla sostanza somministrata. Ad esempio, i dati possono essere valutati mediante un'analisi di covarianza (ANCOVA) in cui la covariabile è il peso corporeo al momento dell'autopsia. L'analisi dei dati uterini può essere preceduta da una trasformazione logaritmica che stabilizza la varianza. I test di Dunnett e Hsu si prestano per confrontare in parallelo ogni gruppo-dose e i controlli con mezzo disperdente e calcolare gli intervalli di confidenza. Per



individuare eventuali valori anomali (*outlier*) e verificare l'omogeneità delle varianze si può applicare un'analisi del residuo studentizzato. Queste procedure sono state applicate nel programma di validazione dell'OCSE con l'ausilio della PROC GLM del sistema di analisi statistica (SAS Institute, Cary, NC), versione 8 (6)(7).

52. La relazione finale deve contenere le seguenti informazioni.

*Centro di saggio:*

- personale responsabile dello studio e rispettive responsabilità,
- dati dello studio iniziale di controllo positivo e dati periodici di controllo positivo (cfr. paragrafi 26 e 27).

*Sostanza chimica in esame:*

- caratterizzazione della sostanza chimica in esame,
- natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche,
- metodo e frequenza della preparazione delle diluizioni,
- qualsiasi dato ottenuto sulla stabilità,
- qualsiasi analisi delle soluzioni somministrate.

*Mezzo disperdente:*

- caratterizzazione del mezzo disperdente utilizzato nella prova (natura, fornitore e lotto),
- giustificazione della scelta del mezzo disperdente (se diverso dall'acqua).

*Animali sperimentali:*

- specie e ceppo utilizzati e giustificazione della scelta,
- fornitore e stabilimento specifico del fornitore,
- età all'epoca della consegna e data di nascita,
- per gli animali immaturi, indicare se forniti con la madre o altra femmina che allatta e data dello svezzamento,
- dettagli della procedura di acclimatazione degli animali,
- numero di animali per gabbia,
- dettagli e metodo di identificazione dei singoli esemplari e dei gruppi.

*Condizioni sperimentali:*

- dettagli del processo di randomizzazione (ad esempio, metodo utilizzato),
- motivazione della scelta delle dosi,
- dettagli della formulazione della sostanza chimica in esame, delle concentrazioni ottenute, della stabilità e dell'omogeneità,
- dettagli della somministrazione della sostanza chimica in esame e motivazione della scelta della via di esposizione,
- dieta (nome, tipo, fornitore, composizione e, se noti, livelli di fitoestrogeni),
- tipo di acqua (ad esempio, di rubinetto o filtrata) e modo di somministrazione (abbeveratoi alimentati da un grande recipiente, biberon ecc.),
- lettiera (nome, tipo, fornitore, composizione),
- dati sulle condizioni di stabulazione, fotoperiodo, temperatura, umidità e pulizia del locale,
- descrizione dettagliata dell'autopsia e della pesatura degli uteri,
- descrizione dei metodi statistici.

## Risultati

### Per ciascun animale:

- registrazione giornaliera del peso corporeo (in grammi, arrotondato al primo decimale), a partire dal momento dell'assegnazione al gruppo fino all'autopsia,
- età dell'animale (espressa in giorni, tenuto conto che il giorno 0 è quello della nascita) all'inizio della somministrazione della sostanza in esame,
- data e ora di ciascuna somministrazione,
- volume calcolato e dosaggio somministrato e osservazioni sulle eventuali perdite di prodotto durante o dopo la somministrazione,
- registrazione giornaliera dello stato dell'animale, con particolare indicazione dei sintomi e delle osservazioni,
- causa sospetta del decesso (se l'animale è trovato morto o moribondo durante lo studio),
- data e ora dell'eutanasia e tempo trascorso dalla somministrazione dell'ultima dose,
- peso uterino umido (in mg, arrotondato al primo decimale) e eventuali osservazioni sulle perdite di fluido del lume durante la dissezione e la preparazione per la pesata,
- peso uterino secco (in mg, arrotondato al primo decimale).

### Per ciascun gruppo di animali:

- registrazione giornaliera del peso corporeo medio (in grammi, arrotondato al primo decimale) e deviazioni standard (a partire dal momento dell'assegnazione al gruppo fino all'autopsia),
- peso uterino medio fresco e secco (in mg, arrotondato al primo decimale) e deviazioni standard,
- se misurato, consumo alimentare giornaliero (calcolato in grammi di cibo consumato per animale),
- risultati delle analisi statistiche comparative del peso uterino fresco e secco dei gruppi trattati e di quello dei gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente,
- risultati delle analisi statistiche comparative del peso corporeo complessivo e dell'aumento di peso corporeo dei gruppi trattati con quello dei gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente.

### 53. Tabella riassuntiva degli elementi salienti del metodo di prova

	<b>Ratto</b>	<b>Topo</b>
<b>Animali</b>		
Ceppo	Ceppo di roditori comunemente usato in laboratorio	
Numero di animali	Un minimo di 6 animali per gruppo	
Numero di gruppi	Un minimo di 2 gruppi sperimentali (cfr. paragrafo 33) e un gruppo di controllo negativo Per orientamenti sui gruppi di controllo positivi, cfr. paragrafi 26 e 27	
<b>Condizioni di stabulazione e alimentazione</b>		
T° locale di stabulazione	22 °C ± 3 °C	
Umidità relativa	50-60 % non inferiore a 30 % né superiore a 70 %	
Fotoperiodo	12:12 (luce/buio)	
Dieta e acqua da bere	Ad libitum	

	<b>Ratto</b>	<b>Topo</b>
Stabulazione	Individuale o in gruppi di tre animali al massimo (gabbie collettive raccomandate per gli animali immaturi)	
Dieta e lettiera	Bassi livelli di fitoestrogeni raccomandati nella dieta e nella lettiera	
<b>Protocollo</b>		
Metodo	Metodo con femmine immature non ovariectomizzate (da privilegiare) Metodo con femmine adulte ovariectomizzate	Metodo con femmine adulte ovariectomizzate
Età di trattamento degli animali immaturi	Non prima del 18° giorno postnatale Fine trattamento prima del 25° giorno postnatale	Non pertinente per questo metodo
Età all'ovariectomia	Fra 6 e 8 settimane	
Età di trattamento degli animali ovariectomizzati	Almeno 14 giorni devono intercorrere tra l'ovariectomia e il 1° giorno di somministrazione	Almeno 7 giorni devono intercorrere tra l'ovariectomia e il 1° giorno di somministrazione
Peso corporeo	La variazione del peso corporeo deve essere minima e non superiore a $\pm 20\%$ del peso medio	
<b>Dosaggio</b>		
Via di somministrazione	Sonda orogastrica o iniezione sottocutanea	
Frequenza di somministrazione	Dose unica giornaliera	
Volume somministrato per sonda e iniezione	$\leq 5$ ml/kg peso corporeo (o fino a 10 ml/kg peso corporeo in caso di soluzioni acquose) (in 2 siti di iniezione sottocutanea)	
Durata della somministrazione	3 giorni consecutivi per le femmine immature Almeno 3 giorni consecutivi per le femmine ovariectomizzate	7 giorni consecutivi per le femmine ovariectomizzate
Data dell'autopsia	Circa 24 ore dopo l'ultima dose	
<b>Risultati</b>		
Risposta positiva	Aumento statisticamente significativo del peso uterino medio (umido e/o secco)	
Estrogeno di riferimento	17- $\alpha$ -etinilestradiolo	

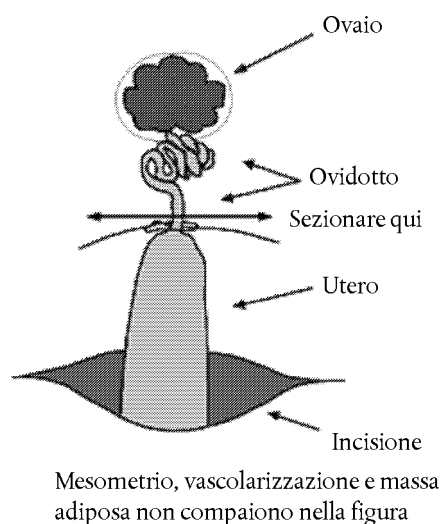
#### ORIENTAMENTI PER L'INTERPRETAZIONE E L'ACCETTAZIONE DEI RISULTATI

54. In genere, una prova per la ricerca di estrogeni è da considerarsi positiva se si constata un aumento statisticamente significativo del peso uterino ( $p < 0,05$ ), almeno nel gruppo trattato con la dose più elevata rispetto al gruppo di controllo con solvente. Il risultato positivo è corroborato dalla dimostrazione di una relazione biologicamente plausibile tra la dose e l'entità della risposta, tenendo presente che la sovrapposizione degli effetti estrogenici e antiestrogenici della sostanza in esame può influire sull'andamento della curva dose-risposta.
55. Per poter interpretare correttamente i dati occorre fare attenzione a non superare la dose massima tollerata, valutando scrupolosamente a tal fine la riduzione del peso corporeo, i segni clinici e altri reperti.

56. Un elemento importante da considerare per l'accettazione dei dati del saggio uterotrofico è il peso uterino del gruppo di controllo trattato con il mezzo disperdente. Se i valori del gruppo di controllo sono elevati possono compromettere la reattività del saggio e la capacità di individuare agonisti degli estrogeni ad azione molto debole. I dati ricavati dalla letteratura e quelli ottenuti durante la convalida del saggio uterotrofico paiono indicare che le medie dei controlli possono essere spontaneamente alte, in particolare negli animali immaturi (2)(3)(6)(9). Poiché il peso uterino delle femmine di ratto immature dipende da molte variabili, come il ceppo o il peso corporeo, non è possibile stabilire un limite massimo preciso per il peso uterino. A titolo indicativo, se il peso uterino secco nei controlli immaturi è compreso tra 40 e 45 mg, i risultati possono essere ritenuti sospetti, e se supera i 45 mg può essere necessario ripetere la prova, valutando comunque caso per caso (3)(6)(8). Nelle prove con femmine di ratto adulte occorre tener presente che se l'ovariectomia è stata incompleta i resti di tessuto ovarico possono produrre estrogeni endogeni e ritardare la regressione del peso uterino.
57. Per i gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente, un peso uterino secco inferiore a 0,09 % del peso corporeo per gli animali immaturi e a 0,04 % per gli animali giovani ovariectomizzati pare dare risultati accettabili [cfr. tabella 31 (2)]. Se il peso uterino dei controlli è superiore a questi valori, occorre verificare vari fattori, in particolare l'età degli animali, l'esito dell'ovariectomia, i fitoestrogeni presenti nella dieta ecc., e un eventuale risultato negativo (nessun indizio di attività estrogenica) deve essere considerato con prudenza.
58. Il laboratorio deve conservare i dati storici riguardanti i gruppi di controllo trattati con il mezzo disperdente, così come i dati storici sugli effetti degli estrogeni di riferimento positivi, come il 17 $\alpha$ -etinilestradiolo. Il laboratorio può anche testare gli effetti di agonisti degli estrogeni di cui è nota la debole attività. Per garantire che i metodi impiegati dal laboratorio siano sufficientemente sensibili, tutti questi dati possono essere confrontati con i dati disponibili (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8).
59. Nello studio di validazione dell'OCSE, la variabilità ponderale si è rivelata minore negli uteri asciutti che in quelli umidi (6) (7). Tuttavia, una risposta significativa nell'uno o nell'altro caso sta a indicare che la sostanza in esame è positiva (vale a dire, esplica attività estrogenica).
60. Sebbene la risposta uterotrofica non sia unicamente d'origine estrogenica, un risultato positivo del saggio uterotrofico deve essere in linea di principio interpretato come prova di attività estrogenica in vivo, e deve normalmente dar luogo a ricerche più approfondite (cfr. paragrafo 9 e appendice 2, in cui figura il "Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino").

Figura 1

### Schema dell'ablazione chirurgica delle ovaie

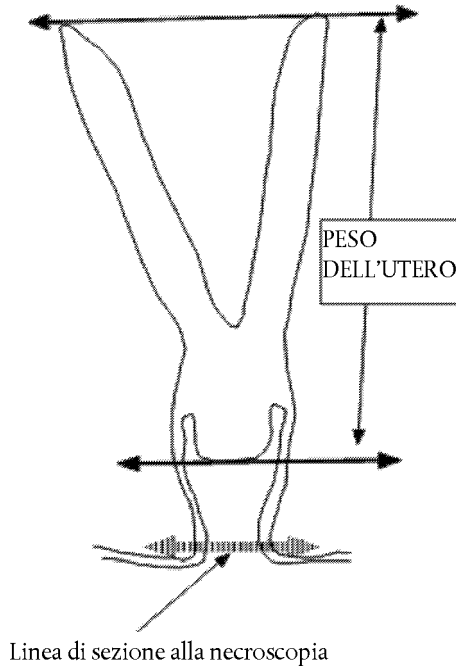


Si inizia incidendo la zona dorso-laterale della parete addominale nel punto intermedio tra il bordo costale inferiore e la cresta iliaca, a qualche millimetro dal margine laterale del muscolo lombare. Si individuano le ovaie all'interno della cavità addominale. Si rimuovono le ovaie dalla cavità addominale e le si colloca su campo sterile,

si lega il dotto tra l'ovaia e l'utero per fermare l'emorragia e si separa l'ovaia con un'incisione al di sopra della legatura, in corrispondenza della giunzione dell'ovidutto e di ciascun corno uterino. Dopo aver escluso il persistere di un'emorragia importante, si sutura la parete addominale e si richiude la pelle mediante clip o sutura. Prima di utilizzare gli animali, li si lascia ristabilire per almeno 14 giorni affinché il peso dell'utero diminuisca.

Figura 2

### Prelievo e preparazione dei tessuti uterini per la pesatura



S'inizia con l'aprire la parete addominale a livello della sinfisi pubica. Si staccano poi entrambe le ovaie, se presenti, e le corna uterine dalla parete addominale dorsale. Si staccano anche la vescica e gli ureteri dal lato ventrale e laterale dell'utero e della vagina. Si scolla il tessuto fibroso del setto retto-vaginale fino a quando si individua la giunzione dell'orifizio vaginale e della cute perineale. Si staccano utero e vagina dal corpo incidendo la parete vaginale appena sopra la giunzione della cute perineale, come illustrato nella figura. L'utero è staccato dal corpo recidendo delicatamente il mesentere nel punto di attacco su tutta la lunghezza della componente dorso-laterale di ciascun corno uterino. Dopo l'asportazione dal corpo, si eliminano il grasso in eccesso e il tessuto connettivo. Se presenti, si staccano le ovaie a livello dell'ovidutto procedendo in modo da evitare la perdita di fluido del lume dal corno uterino. Se l'animale è stato ovariectomizzato, si esaminano i peduncoli per rilevare l'eventuale presenza di tessuto ovarico. Si separa la vagina dall'utero appena sotto la cervice, in modo che quest'ultima resti insieme al corpo dell'utero, come illustrato nella figura. L'utero può a questo punto essere pesato.

DEFINIZIONI

**Antiestrogenicità:** capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività del 17 $\beta$ -estradiolo nei mammiferi.

**Data di nascita:** giorno 0 dopo la nascita.

**Dosaggio:** termine generale che indica la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

**Dose massima tollerata (MTD):** quantità massima di una sostanza chimica che, al momento dell'introduzione nell'organismo, non è fatale per gli animali sperimentali (indicata con LD<sub>0</sub>) (IUPAC, 1993).

**Dose:** quantità di sostanza chimica somministrata. Nel saggio uterotrofico, la dose è espressa come peso della sostanza in esame per unità di peso corporeo dell'animale sperimentale per giorno (ad esempio, mg/kg peso corporeo/giorno).

**Estrogenicità:** capacità di una sostanza chimica di agire come il 17 $\beta$ -estradiolo nei mammiferi.

**Giorno postnatale X:** giorno X di vita dopo il giorno di nascita.

**Sensibilità:** proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per verificare la pertinenza di un metodo.

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

**Sostanza chimica:** sostanza o miscela.

**Specificità:** proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal test. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per verificare la pertinenza di un metodo.

**Uterotrofico:** termine utilizzato per descrivere un influsso positivo sulla crescita dei tessuti dell'utero.

**Validazione:** processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un determinato obiettivo.

---

**Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino**

<p><b>Livello 1</b> Selezione e prioritizzazione sulla base delle informazioni disponibili</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— proprietà fisiche e chimiche, es. peso molecolare, reattività, volatilità, biodegradabilità,</li> <li>— esposizione degli esseri umani e dell'ambiente, es. volume di produzione, rilascio, modi d'uso</li> <li>— pericoli, es. dati tossicologici disponibili</li> </ul>	
<p><b>Livello 2</b> Saggi <i>in vitro</i> che forniscono dati meccanicistici</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— affinità del legame ai recettori degli estrogeni, degli androgeni e degli ormoni tiroidei</li> <li>— attivazione della trascrizione</li> <li>— aromatasi e steroidogenesi <i>in vitro</i></li> <li>— riconoscimento/fissazione sul recettore degli idrocarburi aromatici</li> <li>— relazioni quantitative struttura-attività (QSARs)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— screening preliminari ad alto rendimento</li> <li>— funzione tiroidea</li> <li>— saggio sulla vitellogenina degli epatociti dei pesci</li> <li>— altri (se del caso)</li> </ul>
<p><b>Livello 3</b> Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a un singolo meccanismo ed effetto endocrino</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— saggio uterotropico(estrogeni)</li> <li>— saggio di Hershberger (androgeni)</li> <li>— funzione ormononale non mediata da recettori</li> <li>— altre funzioni (es. tiroidea)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— saggio sulla vitellogenina degli epatociti dei pesci (estrogeni)</li> </ul>
<p><b>Livello 4</b> Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a diversi meccanismi ed effetti endocrini</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— LG OCSE n. 407 migliorata (endpoint basati su meccanismi endocrini)</li> <li>— saggi sulla pubertà su maschi e femmine</li> <li>— saggio sul maschio adulto intatto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— saggio istopatologico sulle gonadi dei pesci</li> <li>— saggio sulla metamorfosi delle rane</li> </ul>
<p><b>Livello 5</b> Saggi <i>in vivo</i> che forniscono dati relativi a meccanismi endocrini e altri meccanismi</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— saggio su una generazione (LG n. 415 migliorata)<sup>1</sup></li> <li>— saggio su due generazioni (LG n. 416 migliorata)<sup>1</sup></li> <li>— prova di screening per la riproduzione (LG n. 421 migliorata)<sup>1</sup></li> <li>— studio combinato sulla tossicità a dosi ripetute e di screening della tossicità per la riproduzione e sullo sviluppo (linea guida OCSE n. 422 migliorata)<sup>1</sup></li> </ul> <p><sup>1</sup> gli eventuali miglioramenti saranno esaminati dal gruppo di gestione e validazione dei saggi sui mammiferi (VMG mamm)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— saggio svolto su una parte o sulla totalità del ciclo di vita di pesci, uccelli, anfibi e invertebrati (sviluppo e riproduzione)</li> </ul>

VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment (gruppo di gestione della validazione nell'ambito della sperimentazione e della valutazione dei mammiferi)

- Nota 1:* è possibile aderire al quadro e discostarsene a partire da qualsiasi livello, in base alla natura delle informazioni necessarie ai fini della valutazione dei rischi e dei pericoli.
- Nota 2:* nel livello 5, l'analisi ecotossicologica deve includere endpoint che evidenzino i meccanismi degli effetti indesiderati nonché dei potenziali danni per la popolazione.
- Nota 3:* se un modello multimodale comprende diversi metodi di prova che forniscono dati su un unico endpoint, tale modello deve sostituire i singoli metodi.
- Nota 4:* ogni sostanza chimica deve essere valutata caso per caso, alla luce di tutte le informazioni disponibili e tenendo presente la funzione dei livelli del quadro.
- Nota 5:* la versione attuale del quadro è da considerarsi esaustiva. Tra le prove che figurano nei livelli 3, 4 e 5, alcune sono già disponibili, altre devono ancora essere convalidate e vi sono incluse provvisoriamente. Saranno confermate una volta messe a punto e convalidate.
- Nota 6:* il livello 5 non è inteso a contenere solo metodi di prova definitivi. I metodi che vi figurano servono ai fini della valutazione generale dei rischi e dei pericoli.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. *Crit. Rev. Toxicol.* 32:445-520.
- (4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. *Environ Health Perspect.* 109:785-94.
- (6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. *Environ. Health Persp.* 111:1530-1549
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. *Environ. Health Persp.* 111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. *Environ. Health Persp.* 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [<sup>125</sup>I]iododeoxyuridine. *Endocrinology* 113:582-587.
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 $\beta$ -estradiol. *Endocrinology* 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. *SÖFW-J.* 127:10-15.



- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science* 118:650-651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369-373.
- (16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.
- (24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320 — 333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33 — 41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288 — 305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 — 291.
- (31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization.* New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.

- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- (37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
- (38) 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).

-  
-  
-  
-  
-  
-  
-