

B.55. SAGGIO DI HERSHBERGER SUL RATTO: SAGGIO DI SCREENING A BREVE TERMINE DELLE PROPRIETÀ (ANTI) ANDROGENICHE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 441 (2009). 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 questi lavori figura la messa a punto di una linea guida per il saggio di Hershberger sul ratto. Dopo svariati decenni di utilizzo da parte dell'industria farmaceutica, questo saggio è stato standardizzato per la prima volta nel 1962 da un comitato ufficiale di esperti come strumento di screening delle sostanze chimiche androgeniche (2). Tra il 2001 e il 2007 il saggio è stato sottoposto ad un vasto programma di validazione, che ha incluso la stesura di un documento di revisione (23), un articolo dettagliato sui metodi (3), una guida per la dissezione (21) e intensi studi intra e interlaboratorio, volti a dimostrare l'affidabilità e la riproducibilità del saggio. Tali studi di validazione sono stati condotti con un potente androgeno di riferimento (testosterone propionato, TP), due potenti androgeni sintetici (acetato di trenbolone e metiltestosterone), un potente farmaco antiandrogenico (flutamida), un potente inibitore (finasteride) della sintesi dell'androgeno naturale diidrotestosterone (DHT), vari pesticidi a debole azione antiandrogenica (linuron, vinclozolin, procimidone, p,p'DDE), un potente inibitore della 5 α riduttasi (finasteride) e due sostanze chimiche negative note (dinitrofenolo e nonilfenolo) (4) (5) (6) (7) (8). Questo metodo di prova, oltre ad essere il risultato della lunga esperienza storica nell'uso del saggio, si fonda sull'esperienza acquisita con il programma di validazione della prova e sui relativi risultati.
2. Il saggio di Hershberger è una prova di screening a breve termine in vivo che impiega tessuti accessori dell'apparato genitale maschile. Risale agli anni '30 ed è stato modificato negli anni '40 includendovi i muscoli dell'apparato genitale maschile che rispondono agli androgeni (2) (9-15). Negli anni '60 sono stati valutati oltre 700 potenziali androgeni per mezzo di una versione standardizzata del protocollo (2) (14), ed è in questo periodo che il saggio si configura come metodo standard sia per gli androgeni che per gli antiandrogeni (2) (15). L'attuale versione si basa sulle variazioni di peso di cinque tessuti androgeno-dipendenti nel ratto maschio peripuberale castrato. Esso valuta la capacità di una sostanza chimica di stimolare le attività biologiche analoghe a quelle indotte dagli agonisti e dagli antagonisti degli androgeni o dagli inibitori della 5 α -riduttasi. I cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti esaminati nel presente metodo sono la prostata ventrale, le vescicole seminali (con i relativi fluidi e ghiandole della coagulazione), il muscolo elevatore dell'ano con il bulbo cavernoso, la coppia di ghiandole bulbouretrali e il glande. Nel ratto maschio peripuberale castrato questi cinque tessuti rispondono tutti agli androgeni con un aumento del peso assoluto. Se stimolati affinché aumentino di peso mediante somministrazione di un potente androgeno di riferimento, questi cinque tessuti rispondono agli antiandrogeni con una diminuzione del peso assoluto. Il primo modello per questo saggio è il maschio peripuberale castrato chirurgicamente, che è stato convalidato nelle fasi 1, 2 e 3 del programma di validazione di Hershberger.
3. Il saggio di Hershberger è utilizzato come prova meccanicistica di screening in vivo degli agonisti degli androgeni, degli antagonisti degli androgeni e degli inibitori della 5 α -riduttasi e la sua applicazione va vista 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 di Hershberger figura al livello 3 come saggio in vivo che fornisce dati riguardo a un unico meccanismo endocrino, ovvero l'attività (anti)androgenica. Questo saggio è destinato a far parte di una batteria di prove in vitro e in vivo concepita per individuare le sostanze chimiche potenzialmente in grado di interagire con il sistema endocrino, e consentire di valutarne i pericoli e i rischi per la salute umana o per l'ambiente.

4. Per evitare la castrazione, in un'ottica di attenzione al benessere degli animali, si è cercato un modello alternativo nel maschio svezzato intatto (non castrato) sottoposto a stimolazione. Il metodo con il maschio svezzato stimolato è stato convalidato (24), sebbene negli studi di validazione questa versione del saggio di Hershberger non sia parsa sempre in grado di evidenziare, alle dosi testate, gli effetti delle sostanze a debole attività antiandrogenica sul peso degli organi androgeno-dipendenti. Questo modello non è stato perciò incluso nel presente metodo di prova. Tuttavia, tenuto conto che il suo uso non solo è positivo in termini di benessere degli animali, ma può anche fornire informazioni su altri modi di azione, esso è illustrato nel documento d'orientamento dell'OCSE n. 115 (25).

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

5. Gli agonisti e gli antagonisti degli androgeni fungono da ligandi dei recettori androgenici e possono, rispettivamente, attivare o inibire la trascrizione del gene regolata dal recettore. Alcune sostanze chimiche, inoltre, inibiscono la conversione del testosterone in diidrotestosterone, l'androgeno naturale più potente, a livello di alcuni tessuti bersaglio degli androgeni (inibitori della 5 α -riduttasi). Tali sostanze possono avere effetti indesiderati sulla salute, in particolare sulla riproduzione e sullo sviluppo. È pertanto necessario, a fini di regolamentazione, potere esaminare e valutare rapidamente l'eventuale attività agonista o antagonista degli androgeni o inibitrice della 5 α -riduttasi, esplicita da una sostanza chimica. Sebbene apporti informazioni utili, l'affinità di un ligando per un recettore androgenico misurata dal suo legame con il recettore oppure l'attivazione della trascrizione di geni reporter in vitro non sono gli unici fattori che possono determinare un eventuale 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, ed è perciò necessario indagare l'eventuale attività di una sostanza chimica in vivo, in condizioni sperimentali e di esposizione idonee. La valutazione in vivo è meno utile se le caratteristiche chimiche della sostanza relative all'assorbimento, alla distribuzione, al metabolismo e all'eliminazione (ADME) sono note. I tessuti androgeno-dipendenti rispondono con una crescita rapida e vigorosa alla stimolazione con androgeni, in particolare nei ratti maschi prepuberali castrati. I roditori, in particolare il ratto, sono ampiamente utilizzati anche negli studi di tossicità per la caratterizzazione dei pericoli. Pertanto, la versione del saggio che utilizza il ratto prepuberale castrato e i cinque tessuti bersaglio è adatta per lo screening in vivo degli agonisti e degli antagonisti degli androgeni e degli inibitori della 5 α -riduttasi.
6. Il presente metodo di prova si basa sui protocolli impiegati nello studio di validazione dell'OCSE che si sono dimostrati affidabili e riproducibili negli studi intra e interlaboratorio (4)(5)(6)(7)(8). Il presente metodo contempla sia il protocollo per gli androgeni sia quello per gli antiandrogeni.
7. Sebbene nel programma di validazione dell'OCSE del saggio di Hershberger la dose di TP utilizzata dai vari laboratori non fosse la stessa (0,2 e 0,4 mg/kg/giorno, per iniezione sottocutanea), poche sono le differenze constatate nella capacità di queste due varianti del protocollo di rilevare l'attività antiandrogenica, sia debole che forte. È però evidente che la dose di TP non deve essere troppo elevata da bloccare gli effetti degli antagonisti deboli dei recettori per gli androgeni o troppo bassa da indurre una crescita scarsa dei tessuti androgenici, anche senza concomitante somministrazione di antiandrogeni.
8. La crescita dei tessuti androgeno-dipendenti non è una risposta unicamente di origine androgenica; anche altri fattori, diversi dagli agonisti degli androgeni, possono alterare il peso di alcuni tessuti. La crescita simultanea di vari tessuti corrobora però l'ipotesi di un meccanismo più specifico di natura androgenica. Ad esempio, somministrando dosi elevate di estrogeni potenti si è osservato un aumento ponderale delle vescicole seminali, ma non degli altri tessuti androgeno-dipendenti. Le sostanze chimiche antiandrogeniche possono fungere da antagonisti dei recettori per gli androgeni oppure da inibitori della 5 α -riduttasi. L'effetto prodotto dagli inibitori della 5 α -riduttasi è variabile, perché la conversione nel più potente diidrotestosterone dipende dal tipo di tessuto. Gli antiandrogeni che inibiscono la 5 α — riduttasi, come la finasteride, hanno effetti più marcati nella prostata ventrale rispetto a un potente antagonista di recettori per gli androgeni, come il flutamide. Questa differenza di risposta dei tessuti può servire per distinguere i modi di azione mediati dai recettori androgenici da quelli mediati dalla 5 α -riduttasi. Inoltre, il recettore dell'androgeno è imparentato, in termini di evoluzione, con quello di altri ormoni steroidei, e vi sono alcuni altri ormoni che, se somministrati a dosi elevate suprafisiologiche, possono legarsi con esso e contrastare gli effetti d'attivazione della crescita indotti dal TP (13). È altresì plausibile che un metabolismo steroideo più intenso e il conseguente calo del tenore sierico di testosterone possano ridurre la crescita dei tessuti androgeno-dipendenti. Pertanto, l'esito positivo del saggio di Hershberger deve di norma essere valutato adottando un approccio basato sulla forza probante dei dati, che prevede saggi in vitro, quali i saggi di legame al recettore estrogenico e al recettore androgenico e relativi saggi di attivazione della trascrizione, altri saggi in vivo che esaminano analoghi tessuti bersaglio degli androgeni, come il saggio sul maschio in età puberale, il saggio di 15 giorni sul maschio adulto intatto o gli studi a dosi ripetute su 28 o 90 giorni.

9. L'esperienza mostra che gli androgeni xenobiotici sono più rari degli antiandrogeni xenobiotici. Si prevede quindi che il saggio di Hershberger sia utilizzato principalmente per lo screening degli antiandrogeni, sebbene se ne possa raccomandare l'applicazione anche agli androgeni nel caso delle sostanze chimiche steroidee o sostanze analoghe agli steroidi, come pure per le sostanze chimiche per le quali i metodi dei livelli 1 o 2 del quadro concettuale (appendice 2) hanno indicato possibili effetti androgenici. Analogamente, le prove di livello 5 permettono di osservare effetti indesiderati associati a profili (anti)androgenici, il che comporta la necessità di valutare se la sostanza chimica in causa agisce per via endocrina.
10. Tutti i protocolli che prevedono l'uso di animali rispetteranno le norme locali in materia di benessere animale; le descrizioni 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 (26). Ulteriori orientamenti relativi al trattamento degli animali nel rispetto delle norme etiche sono stati formulati dall'OCSE (17).
11. Come per ogni saggio che utilizza animali da esperimento, occorre valutare attentamente la necessità di effettuare il presente studio. Fondamentalmente sono due le ragioni che possono giustificare tale decisione:
 - potenziale di esposizione elevato (livello 1 del quadro concettuale) oppure elementi indicanti attività (anti) androgenica ricavati da saggi in vitro (livello 2), tali da rendere necessario investigare se tali effetti si possono produrre in vivo;
 - effetti di natura (anti)androgenica in saggi in vivo di livello 4 o 5, tali da rendere necessario investigare il modo d'azione specifico, ad esempio, per determinare se gli effetti sono dovuti a un meccanismo (anti)androgenico.
12. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

13. La sensibilità del saggio di Hershberger si fonda sull'utilizzazione di maschi con produzione minima di androgeni endogeni. A tal fine si impiegano animali castrati, lasciando trascorrere un periodo dalla castrazione che permetta ai tessuti bersaglio di tornare a un peso di riferimento minimo e uniforme. Pertanto, quando si ricerca una potenziale attività androgenica, i livelli endogeni di androgeni in circolazione sono bassi, l'asse ipotalamo-ipofisario-gonadico è incapace di compensarli con meccanismi di retroregolazione, la capacità di risposta dei tessuti è massima e la variabilità del peso iniziale dei tessuti è minima. Quando si ricerca una potenziale attività antiandrogenica, si ottiene un maggior aumento ponderale dei tessuti se li si stimola con un androgeno di riferimento. Il saggio di Hershberger richiede quindi solo 6 animali per gruppo-dose, mentre per altri saggi che utilizzano maschi puberali o adulti intatti il numero consigliato è di 15 maschi per gruppo-dose.
14. La castrazione dei ratti maschi in età peripuberale deve essere fatta in modo idoneo, con l'impiego di tecniche autorizzate di anestesia e asepsi. Per eliminare i disturbi post operatori, nei primi giorni successivi all'intervento si somministrano analgesici. La castrazione migliora la precisione con la quale il saggio rileva gli androgeni e gli antiandrogeni deboli, sopprimendo, innanzitutto, i meccanismi compensatori di retroregolazione endocrina che esistono nell'animale intatto e che possono attenuare gli effetti degli androgeni e degli antiandrogeni somministrati, in secondo luogo eliminando la grande variabilità del tenore sierico di testosterone da un individuo all'altro. Pertanto, la castrazione riduce il numero di animali necessari per ricercare le attività endocrine in oggetto.
15. Nello screening di un'attività androgenica potenziale, la sostanza in esame è somministrata ogni giorno, per un periodo di 10 giorni consecutivi, tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Le sostanze in esame sono somministrate ad almeno due gruppi di animali da esperimento, esponendo ogni gruppo a un livello di dose. Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Un aumento ponderale statisticamente significativo di due o più organi bersaglio nei gruppi che ricevono la sostanza rispetto al gruppo di controllo che riceve il mezzo disperdente è indice di attività androgenica potenziale della sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 60). Gli androgeni come il trenbolone, che non subiscono l'azione della 5 α -riduttasi, producono effetti più pronunciati sul muscolo elevatore dell'ano, sul bulbocavernoso e sul glande rispetto al TP, sebbene un accrescimento debba rilevarsi in tutti i tessuti.
16. Nello screening di un'attività antiandrogenica potenziale, la sostanza in esame è somministrata ogni giorno, per un periodo di 10 giorni consecutivi, tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea, insieme a dosi

giornaliere di TP (0,2 o 0,4 mg/kg/giorno) per iniezione sottocutanea. Dato che il programma di validazione ha dimostrato l'efficacia di entrambe le suddette dosi di TP nella ricerca di antiandrogeni, il saggio va effettuato scegliendo una delle due. La sostanza in esame è somministrata in dosi scalari ad almeno tre gruppi di animali, esponendo ogni gruppo a un livello di dose. Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Un calo ponderale statisticamente significativo di due o più organi bersaglio nei gruppi che ricevono la sostanza e il TP, rispetto al gruppo di controllo che riceve solo TP, è indice di attività antiandrogenica potenziale della sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 61).

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione della specie e del ceppo

17. L'uso del ratto come specie di routine per il saggio di Hershberger risale agli anni '30. Benché sul piano biologico sia plausibile che il ratto e il topo rispondano in modo simile, nel saggio di Hershberger si preferisce utilizzare il ratto proprio grazie ai 70 anni di esperienza acquisita con questo modello. Inoltre, poiché i dati del saggio di Hershberger possono servire da risultati preliminari per uno studio multigenerazionale a lungo termine, è possibile utilizzare animali della stessa specie, dello stesso ceppo e della stessa provenienza in entrambi gli studi.
18. Questo protocollo lascia al laboratorio la facoltà di scegliere il ceppo di ratto da utilizzare nel saggio, che sarà in genere quello da esso abitualmente impiegato. Si possono scegliere i ceppi di ratto di uso comune nei laboratori, evitando però i ceppi che giungono a maturità oltre il 42° giorno di vita, dato che la castrazione dei maschi al 42° giorno può impedire la determinazione del peso del glande, che può essere effettuata soltanto dopo la separazione del prepuzio dal corpo del pene. Salvo in rare eccezioni, non si utilizzano pertanto i ceppi derivati dal ratto Fisher 344, il cui sviluppo sessuale ha una cronologia diversa da quella degli altri ceppi usati più comunemente, come Sprague Dawley o Wistar (16). Se vi è la necessità di utilizzare questo ceppo, il laboratorio dovrà castrare gli individui ad un'epoca leggermente posteriore e dimostrare la sensibilità del ceppo utilizzato. Il laboratorio deve motivare con chiarezza la scelta del ceppo di ratto. Se il saggio di screening è preliminare a uno studio a dose ripetuta per via orale, a uno studio sulla riproduzione e sullo sviluppo, o a uno studio a lungo termine, occorre usare di preferenza, in tutti gli studi, animali provenienti dallo stesso ceppo e aventi la medesima origine.

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 regolamentazioni locali più rigorose, 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 (26). La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 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. La stabulazione in gabbie collettive è preferibile all'isolamento a causa della giovane età degli animali e per il fatto che i ratti sono animali socievoli. Alloggiando due o tre animali per gabbia si evita l'affollamento e lo stress che ne deriva e che può interferire con la regolazione ormonale dello sviluppo del tessuto sessuale accessorio. Le gabbie devono essere accuratamente pulite per eliminare i possibili contaminanti e sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. La scelta di gabbie di congrue dimensioni (circa 2 000 cm²) eviterà l'affollamento.
21. Ogni animale è identificato individualmente (ad esempio, con un marchio o un'etichetta sull'orecchia) con metodo non cruento. Il metodo di identificazione deve essere indicato nella relazione.
22. Gli animali ricevono a volontà dieta da laboratorio e acqua da bere. Il laboratorio utilizza nel saggio di Hershberger la dieta da laboratorio che normalmente impiega nella sperimentazione sulle sostanze chimiche. Negli studi di validazione del saggio, non sono stati osservati effetti né variabilità imputabili alla dieta. Il tipo di dieta utilizzata deve essere indicata nella relazione e un campione del mangime somministrato deve essere conservato per eventuali analisi che potrebbero essere necessarie in un secondo tempo.

Criteri di prestazione relativi al peso degli organi androgeno-dipendenti

23. Durante lo studio di validazione non è emerso alcun dato comprovante che un calo del peso corporeo incida sull'aumento o sulla diminuzione della crescita ponderale dei tessuti bersaglio (ossia, dei tessuti che devono essere pesati nel presente studio).

24. Tra i vari ceppi di ratto utilizzati con successo nel programma di validazione, il peso degli organi androgeno-dipendenti era più elevato nei ceppi più corpulenti che in quelli più leggeri. Pertanto, i criteri di prestazione del saggio di Hershberger non comprendono il peso assoluto degli organi previsto per i controlli negativi e positivi.
25. Poiché il coefficiente di variazione (CV) per un tessuto è inversamente proporzionale alla potenza statistica, i criteri di prestazione del saggio di Hershberger sono basati su valori massimi di CV per ogni tessuto (tabella 1). I CV sono tratti dagli studi di validazione dell'OCSE. In caso di esito negativo, il laboratorio deve esaminare i CV del gruppo di controllo e del gruppo trattato con la dose più elevata per determinare se sono stati superati i criteri di prestazione relativi al CV massimo.
26. Lo studio dovrà essere ripetuto quando: 1) almeno tre dei dieci possibili CV individuali nel gruppo di controllo e in quello trattato con la dose elevata superano i valori massimi indicati nella tabella 1 per gli studi sugli agonisti e sugli antagonisti; e 2) almeno due tessuti bersaglio sono marginalmente non significativi, ossia, presentano valori r compresi tra 0,05 e 0,10.

Tabella 1

CV massimi ammessi, determinati per i tessuti sessuali accessori bersaglio nel modello animale castrato negli studi di validazione dell'OCSE ⁽¹⁾

Tessuto	Effetti antiandrogenici	Effetti androgenici
Vescicole seminali	40 %	40 %
Prostata ventrale	40 %	45 %
Muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso	20 %	30 %
Ghiandole bulbouretrali	35 %	55 %
Glande	17 %	22 %

PROTOCOLLO

Rispetto della normativa e verifica del laboratorio

27. A differenza del saggio uterotrofico (capitolo B.54 del presente allegato), per il saggio di Hershberger non è necessario dimostrare la competenza del laboratorio prima dell'inizio dello studio, perché il saggio prevede l'esecuzione concomitante di una prova di controllo positivo (testosterone propionato e flutamida) e negativo.

Numero e condizione degli animali

28. Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 6 animali. Ciò vale sia per il protocollo androgenico che per quello antiandrogenico.

Castrazione

29. Dopo il ricevimento degli animali, occorre prevedere un periodo di acclimatazione iniziale di svariati giorni, per assicurarsi che siano sani e vitali. Poiché gli animali castrati prima del 42° giorno di età o il 42° giorno postnatale non sempre presentano separazione prepuziale, la castrazione deve essere effettuata il 42° giorno postnatale o successivamente, ma non prima. Gli animali sono castrati sotto anestesia, incidendo lo scroto e asportando entrambi i testicoli e gli epididimi, con legamento dei vasi sanguigni e dei dotti deferenti. Dopo aver escluso la presenza di emorragia, si chiude lo scroto con sutura o clip. Per alleviare i disturbi post operatori, nei primi giorni successivi all'intervento si somministrano analgesici. Se gli animali sono acquistati già castrati da un fornitore, quest'ultimo ne garantirà l'età e lo stadio di maturazione sessuale.

⁽¹⁾ Il CV massimo per ciascun tessuto è stato determinato in base a un grafico dei valori CV — disposti in ordine crescente — che riprende tutte le medie di tutti gli esperimenti condotti nell'esercizio di validazione utilizzando un determinato modello (agonista o antagonista). Si è considerato che il CV massimo corrispondesse al punto, detto valore soglia, a partire dal quale gli incrementi tra i CV immediatamente più alti della serie diventavano nettamente maggiori di quelli esistenti tra i CV immediatamente anteriori della serie. Va osservato che, sebbene questa analisi abbia consentito di individuare valori soglia relativamente affidabili per il modello antagonista del saggio, le curve del CV nel saggio sugli agonisti hanno mostrato incrementi più uniformi, per cui i CV massimi identificati con tale metodo sono alquanto arbitrari.

Acclimatazione dopo la castrazione

30. Il periodo di acclimatazione degli animali alle condizioni di laboratorio è di almeno 7 giorni dopo la castrazione, per permettere la regressione ponderale dei tessuti bersaglio. Gli animali sono osservati quotidianamente e quelli che mostrano segni di malattia o anomalie fisiche sono ritirati. La somministrazione delle dosi allo studio può quindi iniziare a partire dal 49° giorno d'età, ma non oltre il 60°. Al momento dell'autopsia l'animale non deve avere più di 70 giorni. Questo grado di flessibilità consente al laboratorio una programmazione efficiente del proprio lavoro sperimentale.

Peso corporeo e randomizzazione dei gruppi

31. Le differenze del peso corporeo individuale sono una fonte di variabilità del peso tissutale, sia all'interno che tra i gruppi di animali. Una grande variabilità del peso dei tessuti si traduce in un maggiore coefficiente di variazione (CV) e in una minore potenza statistica del saggio (talvolta denominata "sensibilità del saggio"). È pertanto opportuno limitare le variazioni del peso corporeo, sia sul piano sperimentale che su quello statistico.
32. Sul piano sperimentale, occorre sforzarsi di ridurre le variazioni del peso corporeo all'interno e tra i gruppi in esame. In primo luogo, gli animali di taglia fuori norma non devono partecipare allo studio di coorte. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali non superano $\pm 20\%$ del peso medio (ad esempio, 175 g \pm 35 g per i ratti peripuberale castrati). In secondo luogo, 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. Occorre indicare nella relazione il protocollo di randomizzazione a blocchi utilizzato.
33. Poiché la tossicità può ridurre il peso corporeo dei gruppi trattati rispetto a quello del gruppo di controllo, è possibile impiegare come covariabile statistica il peso corporeo rilevato il primo giorno di somministrazione della sostanza chimica in esame, e non il peso corporeo al momento dell'autopsia.

Dosaggio

34. Per stabilire se una sostanza chimica può avere un'azione androgenica in vivo, in genere è sufficiente allestire due gruppi-dose della sostanza in esame, un gruppo di controllo positivo e un gruppo di controllo del mezzo disperdente (negativo) (cfr. paragrafo 43): è questo il disegno sperimentale da preferirsi per motivi dettati dal benessere degli animali. Se lo scopo è di ottenere una curva della relazione dose-risposta o di estrapolare i risultati per applicarli a dosi più basse, sono necessari almeno 3 gruppi-dose. Se si desidera ottenere informazioni più particolareggiate sull'attività androgenica (quali una stima dell'efficacia) occorre prevedere un altro schema di dosaggio. Se lo studio verte sugli antiandrogeni, la sostanza chimica in esame viene somministrata insieme a un agonista dell'androgeno di riferimento. Si utilizzano almeno 3 gruppi sperimentali con diverse dosi della sostanza in esame, un controllo positivo e un controllo negativo (cfr. paragrafo 44). Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza da esaminare, gli animali del gruppo di controllo devono essere manipolati in modo identico a quelli dei gruppi che ricevono il trattamento. Se la sostanza è somministrata con un mezzo disperdente, il volume del mezzo disperdente somministrato al gruppo di controllo sarà quello massimo utilizzato per i gruppi-dose.
35. 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 DL_{50} e/o alle informazioni sulla tossicità acuta, onde evitare il decesso, sofferenze gravi o distress degli animali (17)(18)(19)(20) e, in secondo luogo, tenendo conto delle informazioni disponibili sulle dosi utilizzate negli studi subcronici e cronici. In generale, la dose più elevata non deve provocare una riduzione del peso corporeo finale degli animali superiore al 10 % del peso dei controlli. La dose più elevata equivale alla dose inferiore tra le due seguenti: 1) la dose più elevata che garantisce la sopravvivenza dell'animale e che non induce tossicità né distress significativi dopo 10 giorni consecutivi di somministrazione, fino ad una dose massima di 1 000 mg/kg/giorno (cfr. paragrafo 36); 2) una dose che induce effetti (anti)androgenici. Per uno screening, sono ammessi intervalli ampi tra i livelli di dose (ad esempio, mezza unità logaritmica, che equivale a un fattore di progressione di 3,2, o persino 1 unità logaritmica). In mancanza di dati utili al riguardo, si può condurre uno studio per identificare il range di dosi utilizzabili (cfr. paragrafo 37).

Dose limite

36. Se in un saggio, condotto secondo i protocolli descritti per il presente studio, la dose limite di 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno e una dose inferiore non producono cambiamenti statisticamente significativi nel peso degli organi sessuali, si può ritenere inutile analizzare altri livelli di dose. Il concetto di dose limite si applica in tutti i casi tranne quando i dati sull'esposizione umana indicano la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

Studio per la determinazione del range di dosi

37. Se necessario, è possibile effettuare uno studio preliminare con pochi animali per individuare il range di dosi e scegliere così i gruppi-dose appropriati [avvalendosi dei metodi per le prove di tossicità acuta, di cui ai capitoli B.1 bis, B.1 ter del presente allegato (27), e alla linea guida OCSE n. 425 (19)]. L'obiettivo, nel caso di un saggio di Hershberger, è di scegliere delle dosi che garantiscano la sopravvivenza degli animali e non inducano tossicità né distress significativi dopo dieci giorni consecutivi di somministrazione della sostanza chimica, fino a una dose limite di 1 000 mg/kg/giorno, come indicato nei paragrafi 35 e 36. A tale riguardo, può essere utile consultare il documento di orientamento dell'OCSE (17), che definisce i segni clinici di tossicità o distress negli animali. Se tale studio preliminare lo consente, dopo dieci giorni di trattamento i tessuti bersaglio possono essere escissi e pesati a circa 24 ore dall'ultima dose. Tali dati potrebbero poi essere utilizzati per facilitare la scelta delle dosi nello studio principale.

Sostanze chimiche di riferimento e mezzo disperdente

38. L'agonista androgenico di riferimento è il testosterone propionato (TP), n. CAS 57-82-5. La dose di TP di riferimento è pari a 0,2 o 0,4 mg/kg di peso corporeo/giorno. L'antagonista androgenico di riferimento è il flutamide (FT), n. CAS 1311-84-7. La dose di FT di riferimento è pari a 3 mg/kg di peso corporeo/giorno, da somministrare insieme alla dose di TP riferimento.
39. Si raccomanda di considerare in primo luogo, ogniqualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa. Dato però che molti ligandi degli androgeni o i loro precursori metabolici tendono ad essere idrofobi, normalmente si utilizza una soluzione/sospensione oleosa (ad esempio, olio di mais, di arachidi, di sesamo o d'oliva). 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 specifiche, facendo attenzione a che i campioni non vengano contaminati e deteriorati.

Somministrazione delle dosi

40. Il TP è somministrato per iniezione sottocutanea, e il FT mediante sonda orogastrica.
41. 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 delle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame. Inoltre, nel caso si ottengano risultati positivi per iniezione, prima di avviare una ricerca approfondita a lungo termine, vanno considerati 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), così come 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).
42. Gli animali ricevono le dosi alla stessa maniera e secondo la stessa cronologia, per dieci giorni consecutivi, a intervalli di circa 24 ore. Il livello di dosaggio è regolato tutti i giorni in base alle pesate giornaliere simultanee degli animali. Ogni giorno di esposizione si annotano il volume e l'ora della somministrazione della dose. Per poter interpretare correttamente i dati occorre fare attenzione a non superare la dose massima indicata al paragrafo 35, valutando scrupolosamente a tal fine tutti gli elementi osservati, in particolare la riduzione del peso corporeo e i segni clinici. La somministrazione orale forzata è effettuata mediante sonda gastrica o idonea 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. Per quanto riguarda le iniezioni sottocutanee, le dosi sono iniettate 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 registrate. Il volume complessivo giornaliero iniettato per ratto non supera 0,5 ml/kg di peso corporeo.

Protocollo specifico per gli agonisti degli androgeni

43. Nella prova per gli agonisti degli androgeni, il mezzo disperdente è il controllo negativo e il gruppo trattato con il TP è il controllo positivo. L'attività biologica analoga a quella indotta dagli agonisti degli androgeni si ricerca somministrando una sostanza chimica ai gruppi prescelti, alle dosi prescelte, per 10 giorni consecutivi. Il peso dei cinque tessuti sessuali accessori dei gruppi che ricevono la sostanza in esame è paragonato a quello del gruppo che riceve il mezzo disperdente al fine di determinare aumenti di peso statisticamente significativi.

Protocollo specifico per gli antagonisti degli androgeni e gli inibitori della 5 α -reduttasi

44. Nella prova per gli antagonisti degli androgeni e gli inibitori della 5 α -reduttasi, il gruppo trattato con il TP è il controllo negativo e il gruppo trattato simultaneamente con dosi di riferimento di TP e FT è il controllo positivo. L'attività biologica analoga a quella indotta dagli antagonisti degli androgeni e dagli inibitori della 5 α -reduttasi si ricerca somministrando la dose di riferimento di TP e la sostanza chimica per 10 giorni consecutivi. Il peso dei cinque tessuti sessuali accessori dei gruppi che ricevono il TP e la sostanza in esame è paragonato a quello del gruppo che riceve solo il TP di riferimento al fine di determinare diminuzioni di peso statisticamente significative.

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

45. Almeno una volta al giorno si eseguono osservazioni cliniche generali, con più frequenza se si constatano segni di tossicità. Le osservazioni sono effettuate di preferenza alla stessa ora e tenendo conto del momento in cui si prevede che gli effetti siano più evidenti dopo la somministrazione delle dosi. Tutti gli animali sono osservati per controllare la mortalità, la morbilità e 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).
46. Gli animali trovati morti sono rimossi ed eliminati senza ulteriore analisi dei dati. La mortalità, di qualsiasi natura, degli animali prima dell'autopsia va indicata nella relazione insieme alle eventuali cause apparenti. Gli animali moribondi devono essere soppressi con metodi non cruenti e riportati nella relazione, insieme alle cause apparenti della morbilità.

Peso corporeo e consumo alimentare

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

Dissezione e pesatura dei tessuti e degli organi

48. Circa 24 ore dopo l'ultima somministrazione della sostanza chimica in esame, i ratti sono sacrificati e dissanguati, secondo le normali procedure del laboratorio che esegue la prova, e sottoposti ad autopsia. Il metodo impiegato per l'eutanasia è riportato nella relazione del laboratorio.
49. 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 sui dati. Il reperto dell'autopsia, vale a dire, alterazioni patologiche/lesioni visibili, va riferito nella relazione.
50. Si pesano i cinque tessuti androgeno-dipendenti (prostata ventrale, vescicole seminali, muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso, coppia di ghiandole bulbouretrali, glande). Per fare ciò, i tessuti sono escissi, accuratamente liberati da eventuali tessuti aderenti e grasso in eccesso e sono pesati (peso fresco dei tessuti non fissati). Ogni tessuto deve essere manipolato con particolare cura per evitare perdita di fluidi e disidratazione, che potrebbero introdurre errori significativi e variabilità facendo risultare un peso inferiore. Alcuni di questi tessuti possono

essere molto piccoli o difficili da dissezionare, il che dà luogo a variabilità. È quindi importante che chi effettua la dissezione dei tessuti sessuali accessori ne conosca bene la procedura standard. L'OCSE ha pubblicato un manuale di procedura operativa standard (SOP) per la dissezione (21) e una formazione rigorosa basata sulla suddetta procedura servirà a limitare una delle potenziali cause di variazione nello studio. Per evitare differenze nel trattamento dei tessuti, l'ideale sarebbe che ciascun tipo di tessuto fosse trattato dallo stesso dissettore. Se ciò non è possibile, l'autopsia deve essere allestita in modo da assegnare a ciascun dissettore la dissezione di un tipo tessuto in tutti i gruppi di trattamento, e non invece di tutti i tessuti di un gruppo di controllo o di un gruppo trattato. Ogni tessuto sessuale accessorio di ciascun animale è pesato senza essere prima tamponato e annotato, e il peso è espresso in mg arrotondato al primo decimale.

51. Alcuni di questi tessuti possono essere molto piccoli o difficili da sezionare, il che dà luogo a variabilità. Precedenti lavori hanno indicato che l'intervallo dei coefficienti di variazione (CV) dipende dalla competenza del laboratorio. In qualche caso all'interno dello stesso laboratorio si sono riscontrate grandi differenze tra il peso assoluto dei tessuti, in particolare la prostata ventrale e le ghiandole bulbouretrali.
52. Il peso del fegato, dei due reni e delle due ghiandole surrenali è una misurazione facoltativa. Anche questi tessuti vanno liberati da eventuali tessuti connettivali e dal grasso. Il peso del fegato è riferito in grammi, arrotondato al primo decimale, mentre quello della coppia di reni e di ghiandole surrenali è riferito in mg, arrotondato al primo decimale. Il fegato, il rene e le ghiandole surrenali non solo risentono dell'azione degli androgeni, ma forniscono anche indizi utili sulla tossicità sistemica.
53. La misura dei livelli sierici di ormone luteinizzante (LH), ormone follicolo-stimolante (FSH) e testosterone (T) è facoltativa. I livelli sierici di testosterone sono utili per determinare se la sostanza in esame induce metabolismo epatico del testosterone, che ne fa abbassare i livelli sierici. Senza i dati relativi al testosterone, questo effetto potrebbe essere imputato a un meccanismo antiandrogenico. I livelli di LH forniscono informazioni sulla capacità di un antiandrogeno di ridurre non solo il peso degli organi, ma anche di influire sulla funzione ipotalamo-pituitaria, il che, secondo studi a lungo termine, può causare tumori ai testicoli. L'FSH è un ormone importante per la spermatogenesi. La misura dei livelli sierici di T4 e T3, anch'essa facoltativa, può fornire informazioni supplementari utili sulla capacità di interferire con l'omeostasi degli ormoni tiroidei. Per misurare i livelli ormonali, si anestetizza il ratto prima dell'autopsia per prelevare il sangue mediante puntura cardiaca, scegliendo accuratamente il protocollo di anestesia affinché non influisca sulla misurazione degli ormoni. Occorre indicare nella relazione il metodo di preparazione del siero, la provenienza dei kit per il dosaggio radioimmunologico o per altre tecniche di misurazione, i protocolli analitici e i risultati ottenuti. I livelli di LH e i livelli di testosterone sono espressi in ng/ml di siero.
54. La dissezione dei tessuti, descritta di seguito, si basa su un manuale dettagliato sull'argomento, corredato di foto, pubblicato come supplemento del programma di validazione (21). Dalla pagina web della Food and Drug Administration coreana si può inoltre accedere a un video che presenta la procedura (22).
 - Con la superficie ventrale dell'animale rivolta verso l'alto, determinare se il prepuzio del pene si è separato dal glande. In tal caso, ritrarre il prepuzio e asportare il glande, pesarlo e annotare il peso (in mg arrotondato al primo decimale);
 - aprire la pelle e la parete addominale, in modo da esporre i visceri. Se si devono pesare anche gli organi facoltativi, asportare e pesare il fegato (valore espresso in grammi al primo decimale), asportare lo stomaco e gli intestini, asportare e pesare la coppia di reni e la coppia di ghiandole surrenali (peso espresso in mg al primo decimale). Questa dissezione espone la vescica e costituisce l'inizio della dissezione dei tessuti sessuali maschili accessori oggetto del presente saggio.
 - Per sezionare la prostata ventrale, separare la vescica dalla lamina muscolare ventrale tagliando il tessuto connettivo lungo la linea mediana. Spostare la vescica in avanti verso le vescicole seminali, in modo da scoprire il lobo sinistro e quello destro della prostata ventrale (ricoperti da uno strato di grasso). Grattare con cura il grasso da entrambi i lobi della prostata ventrale. Spostare delicatamente il lobo destro della prostata ventrale dall'uretra e reciderlo. Tenendo fermo il lobo destro della prostata ventrale, spostare delicatamente il lobo sinistro dall'uretra e reciderlo; pesare e annotare il peso, in mg arrotondato al primo decimale.
 - Per sezionare la vescicola seminale con le ghiandole della coagulazione, spostare la vescica in direzione caudale, in modo da esporre il dotto deferente, il lobo destro e quello sinistro delle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione. Impedire la perdita di fluido applicando una pinza emostatica (clampaggio) alla base delle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, nel punto in cui il dotto deferente si unisce all'uretra. Recidere con cautela le vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, mantenendo in posizione la pinza emostatica, eliminare il grasso e gli annessi, collocarle in una navicella per pesata tarata, ritrarre la pinza emostatica e pesare, annotando poi il peso, espresso in mg al primo decimale.

- Per sezionare il complesso formato dal muscolo elevatore dell'ano con il muscolo bulbocavernoso, è necessario esporre questi muscoli e la base del pene. L'elevatore dell'ano avvolge il colon, mentre i suoi fasci anteriori e il muscolo bulbocavernoso sono attaccati ai bulbi del pene. Asportare la pelle e gli annessi dalla regione perianale che si estende dalla base del pene all'estremità anteriore della ano. Recidere gradualmente il bulbocavernoso dal bulbo del pene e dai tessuti. Tagliare il colon in due, in modo da poter così recidere e asportare l'intera muscolatura formata dall'elevatore dell'ano e dal bulbocavernoso. Dopo averli ripuliti dal grasso e dagli annessi, pesare i muscoli, annotando poi il peso, espresso in mg al primo decimale.
 - Dopo l'asportazione della muscolatura formata dall'elevatore dell'ano e dal bulbocavernoso, sono visibili le ghiandole bulbouretrali (o ghiandole di Cowper), di forma arrotondata, situate alla base dei bulbi del pene e in posizione leggermente dorsale. Occorre procedere alla dissezione con grande cautela, per evitare di tagliare inavvertitamente la sottile capsula e provocare una fuoriuscita di fluido. Pesare la coppia di ghiandole bulbouretrali e annotare il peso, in mg arrotondato al primo decimale.
 - Riferire anche ogni eventuale fuoriuscita di fluido dalle ghiandole avvenuta durante l'autopsia e la dissezione.
55. Se la valutazione di una sostanza chimica richiede l'autopsia di un numero di animali superiore a quanto è ragionevole programmare per un solo giorno, l'inizio dello studio può essere ripartito su due giorni consecutivi, il che vale altrettanto per l'autopsia e le operazioni ad essa inerente. In questo tipo di programmazione, si deve utilizzare ogni giorno la metà degli animali per gruppo di trattamento.
56. Dopo l'autopsia, le carcasse devono essere smaltite in modo adeguato.

RELAZIONE

Dati

57. I dati, riassunti sotto forma di tabella, sono riferiti per individuo (ossia, peso corporeo, peso dei tessuti sessuali accessori, misurazioni facoltative e altre risposte e osservazioni) e per gruppo di animali (medie e deviazioni standard di tutte le misurazioni effettuate). I dati devono indicare il numero di animali all'inizio della prova, il numero degli animali trovati morti durante la prova o che hanno mostrato segni di tossicità, la descrizione dei segni di tossicità osservati, compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità.
58. La relazione finale deve contenere le seguenti informazioni.

Centro di saggio

- Nome del centro, ubicazione
- Direttore dello studio, altro personale e rispettive funzioni nello studio
- Date di inizio e fine dello studio, ossia, primo giorno di somministrazione della sostanza chimica in esame e ultimo giorno di autopsia

Sostanza chimica in esame

- Provenienza, numero di lotto/partita, identità, purezza, indirizzo completo del fornitore e caratterizzazione della sostanza chimica in esame
- Natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche
- Condizioni di stoccaggio, metodo e frequenza di preparazione delle diluizioni
- Qualsiasi dato ottenuto sulla stabilità
- Qualsiasi analisi delle soluzioni/sospensioni somministrate

Mezzo disperdente

- Caratterizzazione del mezzo disperdente (identità, fornitore e numero di lotto)
- Giustificazione della scelta del mezzo disperdente (se diverso dall'acqua)

Animali sperimentali e protocolli di allevamento

- Specie/ceppo utilizzato e giustificazione della loro scelta
- Provenienza o fornitore degli animali, con indirizzo completo
- Numero ed età degli animali forniti

- Condizioni di stabulazione (temperatura, illuminazione ecc.)
- Dieta (nome, tipo, fornitore, numero di lotto, composizione e, se noti, livelli di fitoestrogeni)
- Lettiera (nome, tipo, fornitore, composizione)
- Condizioni di stabulazione e numero di animali per gabbia

Condizioni sperimentali

- Età alla castrazione e durata dell'acclimatazione dopo la castrazione
- Peso di ciascun animale all'inizio della prova (espresso in grammi, arrotondato al primo decimale)
- Processo di randomizzazione e registro dell'assegnazione ai gruppi trattati con il mezzo disperdente, con la sostanza di riferimento e con la sostanza in esame, nonché registro dell'assegnazione alle gabbie
- MEDIA e deviazione standard del peso corporeo per ciascun gruppo per ogni giorno di pesata durante tutto lo studio
- Motivazione della scelta delle dosi
- Via di somministrazione della sostanza chimica in esame e motivazione della scelta della via di esposizione
- Se si tratta di un saggio sull'antiandrogenicità, il trattamento con TP (dose e volume)
- Trattamento con la sostanza chimica in esame (dose e volume)
- Momento della somministrazione delle dosi
- Protocolli di autopsia, comprese le procedure di dissanguamento ed eventuale anestesia
- Se si eseguono analisi del siero, dettagli del metodo. Per esempio, se si utilizza il dosaggio radioimmunologico (RIA), occorre riferire il protocollo RIA, la provenienza del kit RIA, la data di scadenza del kit, il protocollo per il conteggio in scintillazione e la standardizzazione.

Risultati

- Osservazioni giornaliere per ciascun animale durante la somministrazione della sostanza in esame, in particolare:
 - peso corporeo (in grammi, arrotondato al primo decimale),
 - eventuali segni clinici,
 - eventuali misurazioni o annotazioni sul consumo alimentare.
- Osservazioni autoptiche per ciascun animale, in particolare:
 - data dell'autopsia,
 - gruppo di trattamento dell'animale,
 - ID dell'animale,
 - dissettore,
 - giorno e ora dell'autopsia e della dissezione,
 - età dell'animale,
 - peso corporeo finale al momento dell'autopsia, segnalando eventuale aumento o calo ponderale statisticamente significativo,
 - ordine del dissanguamento e della dissezione degli animali al momento dell'autopsia,
 - peso dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti:
 - prostata ventrale (in mg, arrotondato al primo decimale),
 - vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, incluso il fluido (a coppia, in mg al primo decimale),
 - insieme del muscolo elevatore dell'ano e del muscolo bulbocavernoso (in mg, al primo decimale),
 - ghiandole bulbouretrali (a coppia, peso fresco in mg, al primo decimale),
 - glande (peso fresco in mg, al primo decimale),

- peso dei tessuti facoltativi, se determinato:
- fegato (in grammi, al primo decimale),
- rene (a coppia, in mg, al primo decimale),
- ghiandola surrenale (a coppia, in mg, al primo decimale),
- osservazioni generali.
- Analisi degli ormoni sieriche, se effettuate:
 - LH sierico (facoltativo — ng/ml di siero), e
 - T sierico (facoltativo — ng/ml di siero),
- commenti generali.

Sintesi dei dati

I dati sono riassunti sotto forma di tabelle contenenti le dimensioni del campione per ciascun gruppo, la media del valore e l'errore standard della media o la deviazione standard. Nelle tabelle figurano il peso corporeo al momento dell'autopsia, le variazioni del peso corporeo tra l'inizio della somministrazione fino all'autopsia, il peso dei tessuti sessuali bersaglio accessori e il peso degli eventuali organi facoltativi.

Discussione dei risultati

Analisi dei risultati

59. Il peso corporeo e il peso dei singoli organi in sede di autopsia sono oggetto di un'analisi statistica volta a determinare parametri quali l'omogeneità della varianza, mediante congrue trasformazioni dei dati, laddove necessario. I gruppi che hanno ricevuto il trattamento sono confrontati con un gruppo di controllo utilizzando tecniche quali l'analisi ANOVA seguita da confronti a coppie (ad esempio, il test di Dunnett ad una coda) e dall'applicazione di un criterio di differenza statistica, ad esempio, $p \leq 0,05$. Si individuano i gruppi che presentano una significatività statistica. Occorre tuttavia evitare i pesi di "organi relativi", dato che le ipotesi statistiche che sottendono a tale manipolazione dei dati non sono valide.
60. Per quanto concerne l'agonismo degli androgeni, il controllo è costituito dal gruppo sperimentale che riceve solo il mezzo disperdente. Le caratteristiche del modo di azione di una sostanza chimica possono provocare risposte relative diverse nei diversi tessuti, ad esempio il trenbolone, che non subisce l'azione della 5-alfa reduttasi, esercita effetti più pronunciati sul muscolo elevatore dell'ano, sul bulbocavernoso e sul glande rispetto al TP. Un aumento ponderale statisticamente significativo ($p \leq 0,05$) di due o più dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti (prostata ventrale, muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso, glande, ghiandole bulbouretrali e vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione) può essere considerato un risultato positivo relativamente all'azione agonista androgenica, nel qual caso tutti i tessuti bersaglio devono presentare una certa accelerazione della crescita. La valutazione combinata di tutte le risposte dei tessuti degli organi sessuali accessori può essere realizzata tramite un'adeguata analisi multivariata dei dati. Questo metodo può servire per affinare l'analisi, in particolare nel caso in cui un solo tessuto fornisca una risposta statisticamente significativa.
61. Nello studio dell'antagonismo degli androgeni, il controllo è costituito dal gruppo cui è stato somministrato l'androgeno di riferimento (solo il testosterone propionato). Le caratteristiche del modo di azione di una sostanza chimica possono provocare risposte relative diverse nei diversi tessuti, ad esempio gli inibitori della 5-alfa reduttasi, come la finasteride, hanno effetti più marcati nella prostata ventrale che negli altri tessuti, rispetto a un potente antagonista di recettori per gli androgeni, come il flutamide. Una diminuzione ponderale statisticamente significativa ($p \leq 0,05$) di due o più dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti (prostata ventrale, muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso, glande, ghiandole bulbouretrali e vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione), rispetto al trattamento con solo TP, deve essere considerata un risultato positivo relativamente all'azione antagonista androgenica, nel qual caso tutti i tessuti bersaglio devono presentare un certo rallentamento della crescita. La valutazione combinata di tutte le risposte dei tessuti degli organi sessuali accessori può essere realizzata tramite un'adeguata analisi multivariata dei dati. Questo metodo può servire per affinare l'analisi, in particolare nel caso in cui un solo tessuto fornisca una risposta statisticamente significativa.
62. I dati sono riassunti sotto forma di tabelle contenenti la media, l'errore standard della media (è ammessa anche la deviazione standard) e le dimensioni del campione per ciascun gruppo. Devono essere incluse anche tabelle con i dati individuali. Occorre esaminare i valori individuali, la media, l'errore standard (deviazione standard) e i valori del CV dei risultati del controllo per determinare se rispettano i criteri accettabili di coerenza con i valori storici previsti. Se i valori del CV sono superiori a quelli che figurano nella tabella 1 (cfr. paragrafi 25 e 26), occorre determinare, per ciascun peso di organo, se vi sono errori nella registrazione o nella trascrizione dei dati oppure se il laboratorio non è ancora in grado di condurre correttamente la dissezione dei tessuti androgeno-dipendenti e

necessita di ulteriore formazione/pratica. Generalmente, i CV (deviazione standard divisa per il peso medio degli organi) sono riproducibili da un laboratorio all'altro e da uno studio all'altro. I dati presentati devono includere almeno il peso della prostata ventrale, della vescicola seminale, del muscolo elevatore dell'ano con il bulbocavernoso, delle ghiandole bulbouretrali, del glande, del fegato e il peso corporeo, nonché la variazione di quest'ultimo tra l'inizio della somministrazione fino all'autopsia. I dati possono anche essere presentati dopo una correzione di covarianza in funzione del peso corporeo, ma ciò non dispensa dal presentare i dati non corretti. Inoltre, se in qualche gruppo non si osserva la separazione prepuziale, occorre registrare l'incidenza di questo dato e confrontarla statisticamente con il gruppo di controllo utilizzando un test di Fisher esatto.

63. Al momento di verificare la concordanza tra i risultati immessi nel computer e quelli sui fogli di lavoro originali, i valori ponderali degli organi che non sono biologicamente plausibili o che si scostano di oltre tre deviazioni standard rispetto a quelli del gruppo trattato vanno esaminati con molta attenzione ed eventualmente scartati, se si stabilisce che sono probabili errori di registrazione.
 64. Il confronto dei risultati dello studio con i valori del CV dell'OCSE (tabella 1) è spesso una tappa importante dell'interpretazione, che serve a soppesare la validità dei risultati dello studio. Il laboratorio deve conservare i dati storici riguardanti i gruppi di controllo trattati con il mezzo disperdente, così come i dati storici sugli effetti delle sostanze chimiche di riferimento positive, come il TP e l'FT. Il laboratorio può inoltre saggiare periodicamente la risposta ad agonisti e antagonisti degli androgeni noti per la debole azione, e conservare i relativi dati. Questi dati possono essere confrontati con i dati OCSE disponibili per garantire che i metodi del laboratorio presentino una precisione e una potenza statistiche sufficienti.
-

DEFINIZIONI

Androgenico: indicante un influsso positivo sulla crescita dei tessuti androgeno-dipendenti.

Antiandrogenico: indicante la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività del testosterone propionato nei mammiferi.

Data di nascita: giorno 0 dopo la nascita.

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

Dose: quantità di sostanza chimica somministrata. Nel saggio di Hershberger, 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).

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

Moribondo: termine utilizzato per descrivere un animale agonizzante, ossia prossimo alla morte.

Sensibilità: capacità di un metodo di prova di individuare correttamente le sostanze chimiche aventi la proprietà per la quale sono esaminate.

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

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Specificità: capacità di un metodo di prova di individuare correttamente le sostanze chimiche non aventi la proprietà per la quale sono esaminate.

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 fine specifico.

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

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

VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment (gruppo di gestione della validazione per la sperimentazione e la 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 mettano in evidenza i meccanismi degli effetti negativi, nonché i potenziali danni per la popolazione.
- Nota 3:* se un modello multimodale comprende diversi metodi di prova che forniscono dati su un solo 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 non va considerata 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 si limita a contenere solo metodi di prova definitivi. Le prove che vi figurano servono ai fini della valutazione generale dei rischi e dei pericoli.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1998). Reports of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.
- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J*26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J*26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.

- (14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.
- (17) 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.
- (18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (20) 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.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. Cfr. section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html
- (23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- (25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.
- (26) 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).
- (27) I seguenti capitoli del presente allegato:
 - B.1 bis, Tossicità acuta orale — Metodo a dose fissa
 - B.1 ter, Tossicità acuta per via orale — Metodo della classe di tossicità acuta

1 -

-

1

-