

B.56 STUDIO ESTESO DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE SU UNA GENERAZIONE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 443 (2012). Si basa sulla proposta di uno studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione F_1 in varie fasi di vita formulata dal comitato tecnico ACSA (Agricultural Chemical Safety Assessment) — parte dell'HESI (Environmental Sciences Institute), a sua volta parte dell'ILSI (International Life Science Institute) — e che è stata pubblicata in Cooper *et al.*, 2006 (1). L'impostazione dello studio è stata migliorata e resa più chiara in diversi punti per consentire flessibilità e sottolineare l'importanza di partire dalle conoscenze esistenti, integrandole poi con le osservazioni condotte nel corso dello studio per orientare e calibrare la prova. Questo metodo di prova fornisce una descrizione particolareggiata delle procedure operative dello studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione. Il metodo di prova descrive tre coorti di animali di generazione F_1 :

coorte 1: per la valutazione degli endpoint in materia di riproduzione/sviluppo; la coorte può in seguito includere animali di generazione F_2 ;

coorte 2: per la valutazione dell'impatto potenziale dell'esposizione ai prodotti chimici sullo sviluppo del sistema nervoso;

coorte 3: per la valutazione dell'impatto potenziale dell'esposizione ai prodotti chimici sullo sviluppo del sistema immunitario.

2. Le decisioni sull'opportunità di valutare la seconda generazione e di omettere le coorti necessarie a determinare la neurotossicità e/o l'immunotossicità nella fase dello sviluppo vanno prese sia sulla base delle conoscenze esistenti riguardo alla sostanza chimica in esame, sia dei requisiti stabiliti dalle diverse autorità di regolamentazione. L'obiettivo del presente metodo di prova è fornire informazioni dettagliate su come condurre lo studio e valutare ciascuna coorte.
3. La procedura riguardo alla decisione di valutare una seconda generazione, presa a partire da parametri interni, è descritta nel documento di orientamento dell'OCSE n. 117 (39), destinato alle autorità di regolamentazione che si servono di tali parametri.

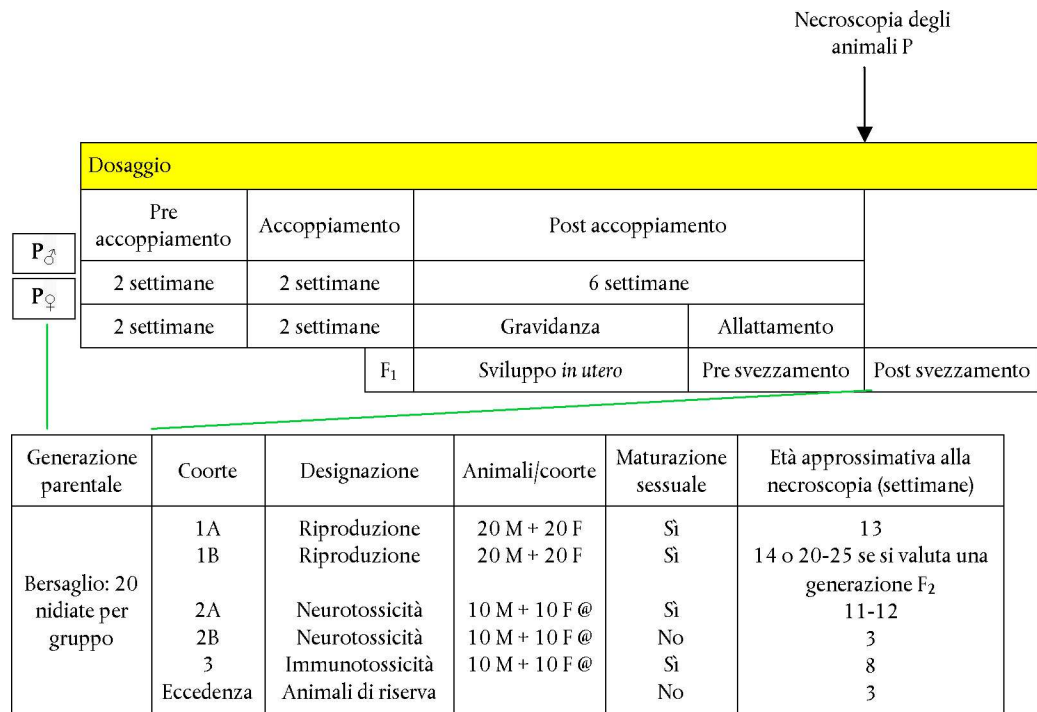
CONSIDERAZIONI INIZIALI E OBIETTIVI

4. Lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione ha come obiettivo principale la valutazione di determinate fasi di vita non coperte da altri tipi di studi della tossicità, nonché degli effetti che possono verificarsi a seguito di un'esposizione pre- e postnatale a una sostanza chimica. Per gli endpoint riproduttivi si prevede di ricorrere inizialmente, se disponibili, alle informazioni derivanti da studi con somministrazione ripetuta della dose [incluso gli studi sulla tossicità per la riproduzione, ad esempio la linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 422 (32)], o da prove di screening a breve termine degli interferenti endocrini [ad esempio, saggio uterotropico — metodo di prova B.54 (36); e saggio di Hershberger — metodo di prova B.55 (37)], per rilevare gli effetti sugli organi riproduttivi maschili e femminili. Per i maschi, ciò può includere la spermatogenesi (istopatologia dei testicoli), mentre per le femmine si ricorre ai cicli estrali, al conteggio dei follicoli/maturazione degli ovociti e all'integrità ovarica (istopatologia). Lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione serve quindi anche come prova per gli endpoint riproduttivi che richiedono l'interazione tra maschi e femmine, tra femmine e feti, nonché tra femmine, discendenti e la generazione F₁ fin dopo la maturità sessuale [cfr. documento di orientamento dell'OCSE n. 151, che sostiene il presente metodo di prova (40)].
5. Il metodo di prova è destinato a fornire una valutazione degli effetti pre- e postnatali delle sostanze chimiche sullo sviluppo, oltre a una valutazione attenta della tossicità sistemica presso le femmine gravide o che allattano e la progenie giovane e adulta. L'esame dettagliato degli endpoint fondamentali dello sviluppo (quali sopravvivenza della progenie, salute neonatale, livello di sviluppo alla nascita, nonché sviluppo fisico e funzionale fino all'età adulta) dovrebbe individuare specifici organi bersaglio nella progenie. Inoltre, lo studio fornirà e/o confermerà informazioni sugli effetti della sostanza chimica in esame sull'integrità e sulle prestazioni degli apparati riproduttori maschili e femminili negli animali adulti. Vengono presi in considerazione in modo specifico, sebbene non esclusivo, i seguenti parametri: funzionalità delle gonadi, ciclo estrale, maturazione dello sperma epididimiale, comportamento in fase di accoppiamento, concepimento, gravidanza, parto e allattamento. Inoltre, le informazioni ottenute dalla valutazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo e della immunotossicità nella fase dello sviluppo caratterizzeranno gli effetti potenziali su tali sistemi. I dati ottenuti dalle prove dovrebbero permettere di determinare i NOAEL (*no observed adverse effect level*, il più alto livello di dose in cui non si osserva un effetto), i LOAEL (*lowest observed adverse effect level*, il più basso livello di dose in cui si osserva un effetto), e/o le dosi di riferimento per i vari endpoint, e/o servire a caratterizzare gli effetti rilevati nei precedenti studi con somministrazione ripetuta, e/o fungere da guida per le prove successive.
6. Il protocollo è illustrato schematicamente nella figura 1. La sostanza chimica in esame viene somministrata continuamente in dosi scalari a diversi gruppi di maschi e femmine sessualmente maturi. A questa generazione parentale (P) si somministra la sostanza per un determinato periodo precedente l'accoppiamento (stabilito sulla base delle informazioni disponibili per la sostanza chimica in esame, ma comunque non inferiore a due settimane) e durante le due settimane di accoppiamento. I maschi P sono trattati più a lungo, almeno fino allo svezzamento della generazione F₁; dovrebbero essere trattati per un minimo di 10 settimane, ma possono essere trattati più a lungo se è necessario chiarire gli effetti sulla riproduzione. Il trattamento delle femmine P continua durante la gravidanza e l'allattamento, fino alla loro soppressione, dopo lo svezzamento della prole (vale a dire 8-10 settimane di trattamento). La progenie F₁ continua a ricevere la sostanza chimica in esame dallo svezzamento all'età adulta. Nel caso venga valutata una seconda generazione [cfr. documento di orientamento dell'OCSE n. 117 (39)], la progenie F₁ continua a ricevere il trattamento fino allo svezzamento della generazione F₂, o fino al termine dello studio.
7. Tutti gli animali vanno sottoposti a osservazione clinica e patologica per individuare eventuali segni di tossicità, in particolare eventuali effetti sull'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori maschili e femminili nonché sulla salute, crescita, sviluppo e funzione della progenie. Allo svezzamento, parte della progenie viene raggruppata in sottogruppi specifici (coorti da 1 a 3, cfr. i paragrafi 33 e 34 e la figura 1) per ulteriori valutazioni, in particolare riguardo alla maturazione sessuale, l'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori, gli endpoint neurologici e comportamentali e le funzioni immunitarie.
8. Durante lo svolgimento dello studio è opportuno seguire i principi guida e le considerazioni di cui al documento di orientamento dell'OCSE n. 19, *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (34).

9. Quando il numero di studi a disposizione consentirà di verificare l'impatto della nuova impostazione qui presentata, il metodo di prova sarà riesaminato e, se necessario, rivisto alla luce dell'esperienza acquisita.

Figura 1

Schema dello studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione



@ uno per nidiata e rappresentativo di 20 nidiata in totale laddove possibile

DESCRIZIONE DEL METODO/PREPARATIVI PER LA PROVA

Animali

Selezione della specie e del ceppo

10. La scelta della specie per la prova sulla tossicità per la riproduzione deve essere attentamente considerata alla luce di tutte le informazioni disponibili. Tuttavia, vista l'abbondanza di dati di controllo e la comparabilità con le prove generali sulla tossicità, il ratto è generalmente la specie preferita e i criteri e le raccomandazioni avanzate nel presente metodo di prova si riferiscono a tale specie. In caso di utilizzo di una specie diversa, occorre giustificare tale scelta e apportare adeguate modifiche al protocollo. Non vanno usati ceppi a bassa fecondità o con un'elevata incidenza nota di difetti spontanei dello sviluppo.

Età, peso corporeo e criteri di inclusione

11. Occorre utilizzare animali genitori sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Lo studio include animali maschi e femmine; queste ultime saranno nullipare e non gravide. Gli animali P saranno sessualmente maturi, di peso simile (per uno stesso sesso) a inizio trattamento, di età simile (circa 90 giorni) al momento dell'accoppiamento, e rappresentativi della specie e del ceppo oggetto dello studio. Dopo l'arrivo, gli animali vanno acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni. Gli animali vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento, in modo che il peso corporeo medio dei gruppi sia comparabile (vale a dire $\pm 20\%$ rispetto al valore medio).

Condizioni di stabulazione e alimentazione

12. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa è mantenuta tra il 30 e il 70 %, con un intervallo ideale tra il 50 e il 60 %. L'illuminazione artificiale ha un fotoperiodo 12:12 (luce/buio). Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata

d'acqua da bere. Occorre prestare particolare attenzione al tenore di fitoestrogeni nella dieta, in quanto la loro presenza a livelli elevati potrebbe incidere su alcuni endpoint riproduttivi. Sono raccomandati regimi alimentari standard a formula aperta, a tenore ridotto di sostanze chimiche estrogene (2)(30). La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se quest'ultima è somministrata con il cibo. Occorre verificare il tenore, l'omogeneità e la stabilità della sostanza in esame nelle diete. L'alimentazione e l'acqua da bere vengono analizzate periodicamente per verificare la presenza di contaminanti. Campioni di ciascun lotto della dieta utilizzata nel corso dello studio sono conservati in condizioni adeguate (ad esempio congelati a - 20 °C) fino all'avvenuta stesura della relazione, qualora i risultati richiedano un'ulteriore analisi degli ingredienti della dieta.

13. Gli animali vanno alloggiati in gabbie, in piccoli gruppi dello stesso sesso e gruppo di trattamento; è possibile alloggiarli individualmente per evitare che si feriscano (ad esempio, nel caso di maschi dopo il periodo di accoppiamento). Le procedure di accoppiamento si svolgono in gabbie adeguate allo scopo. Dopo comprovata copulazione, le femmine che si presume siano gravide vanno alloggiate separatamente, in gabbie apposite per il parto o la maternità dotate di adeguati e specifici materiali per la preparazione del nido. La prole è alloggiata con la rispettiva madre fino allo svezzamento. Gli animali F₁ sono alloggiati in piccoli gruppi, dello stesso sesso e gruppo di trattamento, dallo svezzamento alla soppressione. Se ciò è giustificato da un punto di vista scientifico, gli animali possono essere alloggiati individualmente. Il livello di fitoestrogeni contenuti nel materiale scelto per le lettiere deve essere minimo.

Numero e identificazione degli animali

14. Ogni gruppo di trattamento e di controllo comprende un numero sufficiente di coppie in cui è avvenuta la copulazione da poter fornire circa 20 femmine incinte per ogni gruppo-dose. Lo scopo è ottenere un numero di gravidanze che consenta una valutazione significativa del potenziale della sostanza in esame di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza e sul comportamento materno degli animali della generazione P, nonché sulla crescita e sullo sviluppo della progenie F₁, dal concepimento alla maturità. Se non si ottiene un numero sufficiente di femmine gravide lo studio non è necessariamente invalidato; le circostanze vanno valutate caso per caso, considerando eventualmente la presenza di un nesso causale con la sostanza in esame.
15. Ad ogni animale P viene assegnato un numero identificativo unico prima della somministrazione delle dosi. Se dati di laboratorio precedenti indicano che una notevole proporzione delle femmine non presenta regolari cicli estrali (4 o 5 giorni), si raccomanda di procedere a una valutazione dei cicli estrali prima di iniziare il trattamento. In alternativa, è possibile creare un gruppo più grande così da assicurare che contenga almeno 20 femmine con cicli estrali regolari (4 o 5 giorni) all'inizio del trattamento. Tutta la progenie F₁ viene identificata in modo inequivocabile quando i neonati sono esaminati per la prima volta, il giorno 0 o 1 dopo la nascita (PND 0 o 1). Le registrazioni che indicano la nidiata di origine sono conservate per tutti gli animali F₁, e F₂, se del caso, per tutta la durata dello studio.

Sostanza chimica in esame

Informazioni sulla sostanza chimica in esame

16. La rassegna delle informazioni esistenti è importante in vista delle decisioni riguardanti la via di somministrazione, la scelta del mezzo disperdente, la scelta della specie animale, la selezione delle dosi ed eventuali modifiche del calendario di somministrazione. Pertanto, nella pianificazione dello studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione vanno prese in considerazione tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, cioè: informazioni fisico-chimiche, tossicocinetica (compreso metabolismo specifico alla specie), proprietà tossicodinamiche, rapporti struttura-attività (SAR), processi metabolici in vitro, risultati di precedenti studi di tossicità e informazioni pertinenti sugli analoghi strutturali. Informazioni preliminari sull'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione (ADME) e sulla bioaccumulazione possono essere derivate dalla struttura chimica, dai dati fisico-chimici, dalla capacità di fissazione delle proteine plasmatiche o da studi tossicocinetici, mentre i risultati degli studi di tossicità forniscono ulteriori informazioni, ad esempio sul NOAEL, sul metabolismo o sull'induzione del metabolismo.

Dati tossicocinetici

17. Sebbene non sia richiesto, i dati tossicocinetici provenienti da precedenti prove di definizione del range delle dosi o da altri studi sono estremamente utili al fine di pianificare l'impostazione dello studio, la selezione dei livelli di dose e l'interpretazione dei risultati. Sono di particolare utilità i dati che: 1) verificano l'esposizione dei feti in via di sviluppo e dei piccoli alla sostanza in esame (o ai relativi metaboliti); 2) forniscono una stima della dosimetria interna; e 3) valutano la saturazione potenziale, dipendente dalla dose, dei processi cinetici. Se disponibili, occorre

tenere in considerazione anche ulteriori dati tossicocinetici quali i profili dei metaboliti, i decorsi temporali delle concentrazioni ecc.. Dati tossicocinetici supplementari possono essere rilevati anche durante lo studio principale, purché questo non interferisca con la raccolta e l'interpretazione dei principali endpoint pertinenti a tale studio.

A titolo orientativo, per pianificare uno studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione sono utili i seguenti dati tossicocinetici:

- a fine gravidanza (es. ventesimo giorno di gestazione) — sangue materno e fetale,
- a metà dell'allattamento (PND 10) — sangue materno, sangue del piccolo e/o latte,
- poco dopo lo svezzamento (es. PND 28) — campioni di sangue dei piccoli svezzati.

Sarà necessaria una certa flessibilità nella scelta degli analiti specifici (ad esempio composto progenitore e/o metaboliti) e del programma di campionamento. Ad esempio, quante volte procedere al campionamento e quando farlo in un determinato giorno dipenderà dalla via di esposizione e dalla previa conoscenza delle proprietà tossicocinetiche negli animali non gravidi. Per gli studi che prevedono somministrazione nella dieta, è sufficiente un singolo campionamento alla medesima ora per ciascuno dei giorni prestabiliti selezionati, mentre per gli studi che prevedono una somministrazione tramite sonda gastrica può essere necessario prevedere ulteriori campionamenti onde ottenere una migliore stima del range di dosi interne. Tuttavia, non è necessario tracciare l'integralità della funzione concentrazione-tempo per ogni giorno di campionamento. Se necessario, i prelievi di sangue da feti e neonati di una medesima nidiata destinati ad essere analizzati possono essere raggruppati per sesso.

Via di somministrazione

18. Per scegliere la via di somministrazione occorre tenere conto delle vie più rilevanti per l'esposizione umana. Sebbene il protocollo preveda la somministrazione della sostanza chimica di prova attraverso la dieta, è consentito modificarlo per utilizzare altre vie (acqua da bere, sonda gastrica, inalazione, via cutanea), a seconda delle caratteristiche del prodotto chimico e delle informazioni richieste.

Scelta del mezzo disperdente

19. Ove necessario, la sostanza in esame è disciolta o sospesa in un mezzo disperdente adeguato. Si raccomanda di prendere in considerazione, in primis e ogniqualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta l'uso di una soluzione/sospensione in olio (ad esempio olio di semi di mais). Devono essere note le caratteristiche tossiche dei mezzi disperdenti diversi dall'acqua. Va evitato l'uso di mezzi disperdenti con potenziale tossicità intrinseca (quali acetone, DMSO). È necessario determinare la stabilità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente. In caso venga utilizzato un mezzo disperdente o un altro additivo per facilitare il dosaggio, occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza in esame; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza in esame che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sul consumo di cibo o di acqua o sullo stato nutrizionale degli animali.

Scelta delle dosi

20. Di norma, lo studio deve comprendere almeno tre livelli di dose e un gruppo di controllo parallelo. Nel selezionare livelli adeguati di dose, il ricercatore considera tutte le informazioni disponibili, comprese le informazioni sulla somministrazione provenienti da studi precedenti, i dati tossicocinetici relativi ad animali gravidi o non gravidi, la portata dell'esposizione alla sostanza attraverso l'allattamento e la stima dell'esposizione umana. Se sono disponibili dati tossicocinetici che indicano una saturazione dei processi tossicocinetici legata alla dose, occorre evitare i livelli di dose alti che comportano inevitabilmente saturazione, purché, naturalmente, si preveda che l'esposizione umana sia nettamente inferiore a questo punto di saturazione. In casi simili, il livello di dose più elevato corrisponde o si situa appena al di sopra del punto di flesso verso un comportamento tossicocinetico non lineare.
21. In assenza di dati tossicocinetici pertinenti, i livelli di dose si basano sugli effetti tossici, a meno che non vi siano limiti imposti dalla natura fisico/chimica della sostanza chimica in esame. Se i livelli di dose sono basati sulla tossicità, la dose più elevata va scelta con l'obiettivo di indurre una qualche tossicità sistemica, ma non tale da provocare né il decesso né gravi sofferenze negli animali.
22. Occorre selezionare dosi scalari decrescenti al fine di evidenziare eventuali relazioni dose-effetto e di stabilire i NOAEL o le dosi prossime al limite di rivelabilità che consentirebbero di derivare una dose di riferimento per l'endpoint o gli endpoint più sensibili. Per evitare intervalli importanti tra le dosi per NOAEL e LOAEL, il ricorso a multipli di due o di quattro è generalmente ottimale. L'aggiunta di un quarto gruppo di prova è spesso preferibile all'uso di un intervallo ampio tra le dosi (ad esempio, di un fattore di oltre il 10).

23. Gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali, salvo per il trattamento con la sostanza in esame. Il gruppo di controllo non deve essere trattato, oppure va trattato con un placebo, oppure, qualora si utilizzi un mezzo disperdente per somministrare la sostanza in esame, va trattato col solo mezzo disperdente. Se si utilizza un mezzo disperdente, il gruppo di controllo riceverà il mezzo disperdente al volume più elevato in uso nella prova.

Prova limite

24. Se negli studi con somministrazione ripetuta non appaiono segni di tossicità con un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, oppure se non si prevede tossicità sulla base dei dati relativi a sostanze con una struttura e/o un'azione metabolica analoghe e con proprietà metaboliche in vivo/in vitrosimili, potrebbe non essere necessario procedere a uno studio che utilizza diversi livelli di dose. In casi simili, lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione può limitarsi a un gruppo di controllo e a una dose unica di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno. Tuttavia, qualora si rilevasse che questa dose limite provoca segni di tossicità per la riproduzione o lo sviluppo, sarà necessario svolgere ulteriori studi a dosi inferiori per determinare il NOAEL. Queste considerazioni sulla prova limite si applicano soltanto nel caso in cui il livello di esposizione umana non implica la necessità di valutare un livello di dose più elevato.

PROTOCOLLI

Esposizione della progenie

25. La somministrazione tramite l'alimentazione è il metodo di esposizione da privilegiare. Negli studi che ricorrono a sonda gastrica occorre notare che, normalmente, i piccoli ricevono la sostanza in esame indirettamente, attraverso il latte materno, finché non comincia la somministrazione diretta al momento dello svezzamento. Negli studi che prevedono la somministrazione nella dieta o nell'acqua da bere, i piccoli ricevono la sostanza anche direttamente a partire da quando cominciano ad alimentarsi da soli, durante l'ultima settimana del periodo di allattamento. L'impostazione dello studio viene modificata se vi è scarsa escrezione della sostanza chimica di prova nel latte e se non è comprovata l'esposizione continua della progenie. In questi casi, si provvederà a esporre direttamente i piccoli durante l'allattamento in funzione dei dati tossicocinetici disponibili, della tossicità per la progenie o di cambiamenti nei biomarcatori (3) (4). Prima di avviarli, occorre considerare con attenzione i vantaggi e gli svantaggi di condurre studi che prevedono la somministrazione diretta a piccoli in fase di allattamento (5).

Programma di dosaggio e somministrazione delle dosi

26. Potrebbero essere disponibili alcune informazioni, provenienti da precedenti studi di tossicità a dose ripetuta di durata adeguata, riguardo a cicli estrali, istopatologia degli apparati riproduttori maschili e femminili, e analisi dello sperma testicolare/epididimiale. Per quanto riguarda lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione, la durata del trattamento prima dell'accoppiamento deve quindi permettere di individuare gli effetti sui mutamenti funzionali che possono interferire con il comportamento in fase di accoppiamento e con la fecondazione. Il trattamento prima dell'accoppiamento deve essere sufficientemente lungo da consentire di raggiungere condizioni stazionarie di esposizione nei maschi e nelle femmine P. Nella maggior parte dei casi un trattamento di due settimane prima dell'accoppiamento è ritenuto adeguato. Per le femmine questo periodo corrisponde a 3 o 4 cicli estrali completi e dovrebbe essere sufficiente a individuare eventuali effetti avversi sulla ciclicità. Per i maschi, il periodo corrisponde al tempo necessario per il transito epididimiale degli spermatozoi in fase di maturazione e deve consentire di rilevare effetti post-testicolari sullo sperma (durante le fasi finali della spermiatura e della maturazione dello sperma epididimiale) in fase di accoppiamento. Al momento della soppressione, quando si deve procedere all'istopatologia testicolare ed epididimiale e all'analisi dei parametri dello sperma, i maschi P e F₁ saranno stati esposti per almeno un intero ciclo spermatogenico [(6) (7) (8) (9) e documento di orientamento OCSE n. 151 (40)].
27. Gli scenari di esposizione dei maschi prima dell'accoppiamento possono essere adattati nel caso in cui studi precedenti abbiano messo chiaramente in rilievo una tossicità testicolare (anomalie della spermatogenesi) o degli effetti sull'integrità e funzionalità dello sperma. Analogamente, anche per le femmine la presenza di effetti noti della sostanza in esame sul ciclo estrale e quindi sulla recettività sessuale può giustificare la modifica degli scenari di esposizione prima dell'accoppiamento. In casi particolari può essere accettabile che il trattamento delle femmine P sia avviato solo dopo aver individuato sperma tramite uno striscio vaginale [cfr. documento di orientamento OCSE n. 151 (40)].
28. Una volta stabilita la durata del periodo di esposizione prima dell'accoppiamento, gli animali vengono trattati con la sostanza chimica in esame in continuo, 7 giorni su 7, fino all'autopsia. Tutti gli animali vanno esposti alla sostanza con lo stesso metodo. La somministrazione continua durante il periodo di accoppiamento, della durata di 2 settimane; per le femmine P deve continuare per tutta la gestazione e l'allattamento, fino al giorno della loro soppressione dopo lo svezzamento. I maschi sono trattati in modo identico fino alla loro soppressione, al momento dello svezzamento degli animali F₁. Per l'autopsia, la priorità va alle femmine, che devono essere sottoposte ad autopsia lo stesso giorno di lattazione o un giorno simile. L'autopsia dei maschi può essere scaglionata

su più giorni in funzione delle attrezzature disponibili in laboratorio. Se non è già stato avviato durante il periodo di lattazione, la somministrazione diretta della sostanza a maschi e femmine F₁ selezionati avrà inizio allo svezzamento e continuerà fino alla prevista autopsia, a seconda della coorte a cui sono stati assegnati.

29. Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua da bere è importante impedire che la quantità della sostanza in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dose costante in funzione del peso corporeo di ciascun animale, avendo cura di specificare quale sia l'alternativa prescelta.
30. Se la sostanza in esame viene somministrata tramite sonda gastrica, il volume del liquido da somministrare in una sola volta non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo (0,4 ml/100 g di peso corporeo è il massimo per l'olio, es. olio di semi di mais). Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato va ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose. Il trattamento è somministrato ogni giorno all'incirca alla stessa ora. La dose per ciascun animale si basa normalmente sulla pesata più recente dell'animale e va regolata almeno una volta alla settimana per i maschi adulti e le femmine adulte non gravide, e ogni due giorni per le femmine gravide e gli animali F₁ in caso sia somministrata prima dello svezzamento e durante le 2 settimane dopo lo svezzamento. Se i dati tossicocinetici indicano un trasferimento di lieve entità della sostanza chimica in esame nella placenta, potrebbe essere necessario modificare la dose somministrata mediante sonda gastrica nel corso dell'ultima settimana di gravidanza per impedire l'assunzione di una dose eccessivamente tossica nella madre. Il giorno del parto le femmine non vanno trattate né con sonda gastrica né per altre vie di trattamento che prevedono la manipolazione dell'animale; quel giorno è addirittura preferibile non somministrare la sostanza in esame piuttosto che rischiare di turbare il parto.

Accoppiamento

31. Ogni femmina P viene posta in contatto con un singolo maschio, selezionato casualmente, non imparentato e dello stesso gruppo-dose (coppie 1:1), fino a quando la copulazione è comprovata o sono trascorse 2 settimane. Se i maschi sono insufficienti, ad esempio a causa di mortalità maschile prima della formazione di coppie, si può ricorrere a un maschio che si sia già accoppiato e appaiarlo (1:1) a una seconda femmina, in modo che tutte le femmine possano accoppiarsi. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si riscontra la prova dell'avvenuta copulazione (presenza di un tappo vaginale o di sperma). Gli animali vanno separati non appena possibile dopo aver osservato una prova della copulazione. Se l'accoppiamento non ha avuto luogo dopo 2 settimane, gli animali vengono separati senza ulteriore opportunità per l'accoppiamento. Le coppie vanno identificate chiaramente in sede di registrazione dei dati.

Dimensioni della nidiata

32. Il quarto giorno dopo la nascita è possibile uniformare la dimensione di ogni nidiata eliminando i piccoli in eccesso tramite selezione casuale, in modo da ottenere, nella misura del possibile, cinque maschi e cinque femmine per nidiata. L'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio in base al peso corporeo, non è appropriata. Ogni volta che il numero di maschi o di femmine non permette di avere cinque animali di ciascun sesso per nidiata, è accettabile una regolazione parziale (ad esempio, sei maschi e quattro femmine).

Selezione dei piccoli per studi dopo lo svezzamento (cfr. figura 1)

33. Allo svezzamento (intorno al PND 21) vengono selezionati da tutte le nidiata disponibili fino a un massimo di 20 piccoli per gruppo-dose e gruppo di controllo, che verranno sottoposti a ulteriori esami e allevati fino a raggiunta maturazione sessuale (a meno che siano necessarie prove precedenti). La selezione è casuale, con l'eccezione degli esemplari più piccoli (animali con un peso corporeo al di sotto di oltre due deviazioni standard della media dei piccoli delle rispettive nidiata) che non vanno inclusi poiché è improbabile che siano rappresentativi del gruppo di trattamento.

Al PND 21, i piccoli F₁ selezionati vengono assegnati in modo casuale a una delle tre coorti di animali, nel modo seguente:

coorte 1 (1A e 1B) = prove di tossicità per la riproduzione/nella fase dello sviluppo

coorte 2 (2A e 2B) = prove di neurotossicità nella fase dello sviluppo

coorte 3 = prove di immunotossicità nella fase dello sviluppo

Coorte 1A: un maschio e una femmina/nidiata/gruppo (20/sexo/gruppo): selezione prioritaria per la valutazione primaria degli effetti sull'apparato riproduttivo e della tossicità generale.

Coorte 1B: un maschio e una femmina/nidiata/gruppo (20/sexo/gruppo): selezione prioritaria per una valutazione ulteriore della capacità riproduttiva attraverso l'accoppiamento di animali F_1 , se del caso [cfr. documento di orientamento OCSE n. 117 (39)], e per ottenere ulteriori informazioni istopatologiche nel caso di agenti sospettati di essere tossici per la riproduzione o per il sistema endocrino, oppure nel caso i risultati della coorte 1A siano ambigui.

Coorte 2A: un totale di 20 piccoli per gruppo (10 maschi e 10 femmine per gruppo; un maschio e una femmina per nidiata) destinati a prove neurocomportamentali seguite da valutazione neuroistopatologica in età adulta.

Coorte 2B: un totale di 20 piccoli per gruppo (10 maschi e 10 femmine per gruppo; un maschio e una femmina per nidiata) destinati alla valutazione neuroistopatologica allo svezzamento (PND 21 o PND 22). Se il numero degli animali è insufficiente, vanno assegnati in priorità alla coorte 2A.

Coorte 3: un totale di 20 piccoli per gruppo (10 maschi e 10 femmine per gruppo; uno per nidiata, ove possibile) Potrebbe essere necessario attingere a ulteriori piccoli del gruppo di controllo, che servono come controllo positivo nella prova di risposta anticorpale T-dipendente (TDAR), al PND 56 ± 3 .

34. Se una nidiata non ha abbastanza piccoli per tutte le coorti, la precedenza va assegnata alla coorte 1, che può in seguito produrre una generazione F_2 . È possibile assegnare un numero maggiore di piccoli a una qualsiasi delle coorti in caso di sospetti specifici, ad esempio, se si suppone che un prodotto chimico sia neurotossico, immunotossico o tossico per la riproduzione. Questi piccoli possono essere utilizzati per esami svolti in momenti diversi o per la valutazione di endpoint supplementari. I piccoli non assegnati alle coorti saranno oggetto di un esame biochimico clinico (paragrafo 55) e di autopsia macroscopica (paragrafo 68).

Secondo accoppiamento degli animali P

35. In genere si sconsiglia un secondo accoppiamento per gli animali P perché provoca una perdita di informazioni importanti sul numero dei siti di impianto (e quindi una perdita di dati post-impianto e perinatali, indicatori di un'eventuale azione teratogena) per la prima figliata. Se è necessario verificare o chiarire un dato effetto nelle femmine esposte è meglio estendere lo studio in modo da includere un accoppiamento della generazione F_1 . Tuttavia, è sempre possibile procedere a un secondo accoppiamento di maschi P con femmine non trattate per chiarire risultati ambigui o per meglio caratterizzare gli effetti sulla fertilità osservati in seguito al primo accoppiamento.

OSSERVAZIONI IN VIVO

Osservazioni cliniche

36. Gli animali P e F_1 selezionati sono sottoposti a un'osservazione clinica generale una volta al giorno. Nel caso l'esposizione avvenga tramite sonda gastrica, l'osservazione clinica deve essere svolta prima e dopo la somministrazione della dose (alla ricerca di eventuali segni di tossicità associati ai picchi di concentrazione plasmatica). Occorre registrare i cambiamenti del comportamento pertinenti, i segni di parto difficoltoso o prolungato e tutti i segni di tossicità. Due volte al giorno, o una volta al giorno durante il fine settimana, occorre sorvegliare i segni di grave tossicità, la morbilità e la mortalità sull'insieme degli animali.
37. Inoltre, un esame più dettagliato dell'insieme degli animali P e F_1 (dopo lo svezzamento) viene effettuato su base settimanale, ad esempio in occasione di una pesatura dell'animale in modo da ridurre al minimo lo stress da manipolazione. È necessario svolgere e registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti dal laboratorio che esegue la prova. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di prova. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività neurovegetativa (per esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito). Verranno inoltre registrate le modifiche osservate nel comportamento, nella postura e nella risposta alla manipolazione, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, stereotipia (per esempio tolettatura eccessiva, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (per esempio automutilazione, marcia a ritroso).

Peso corporeo e consumo di cibo/acqua

38. Gli animali P vengono pesati il primo giorno della somministrazione e, successivamente, a cadenza almeno settimanale. Inoltre, le femmine P vengono pesate durante l'allattamento negli stessi giorni di pesatura dei piccoli della loro nidiata (cfr. paragrafo 44). Tutti gli animali F_1 sono pesati individualmente allo svezzamento (PND 21) e, successivamente, a cadenza almeno settimanale. Il peso corporeo va registrato anche il giorno in cui raggiungono la pubertà (completamento della separazione prepuziale o dell'apertura vaginale). Tutti gli animali sono pesati al momento della soppressione.
39. Nel corso dello studio, il consumo di cibo e acqua (nel caso di somministrazione della sostanza in esame nell'acqua da bere) sono registrati almeno settimanalmente negli stessi giorni in cui viene registrato il peso corporeo degli animali (salvo durante la coabitazione). Il consumo di cibo di ciascuna gabbia di animali F_1 viene registrato settimanalmente a cominciare da quando vengono assegnati a una particolare coorte.

Cicli estrali

40. Se sono disponibili informazioni preliminari sugli effetti della sostanza in esame sul ciclo estrale, provenienti da precedenti studi di tossicità a dosi ripetute, è possibile utilizzarle per impostare un protocollo per lo studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione mirato alla sostanza in esame. Normalmente la valutazione della ciclicità estrale (mediante citologia vaginale) verrà avviata all'inizio del periodo di trattamento e continuerà fino alla conferma dell'avvenuto accoppiamento o alla fine del periodo di accoppiamento di due settimane. Se le femmine sono state sottoposte a controllo della normalità dei cicli estrali prima del trattamento, è utile ripetere gli strisci vaginali dopo l'inizio del trattamento; ma se si temono effetti non specifici all'inizio del trattamento (ad esempio, una marcata riduzione nel consumo di cibo), è possibile lasciare agli animali un massimo di due settimane per adattarsi al trattamento, per poi dare inizio alle due settimane di osservazione degli strisci che precedono l'accoppiamento. Se il periodo di trattamento delle femmine viene così esteso (raggiungendo quindi un periodo di trattamento di 4 settimane prima dell'accoppiamento), si deve considerare l'opportunità di acquistare animali più giovani e di estendere il periodo di trattamento dei maschi prima dell'accoppiamento. Durante il prelievo delle cellule vaginali/cervicali occorre prestare attenzione a non ledere la mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogavidanza (10) (11).
41. Gli strisci vaginali vanno esaminati quotidianamente per tutte le femmine F_1 della coorte 1A, a partire dall'apertura vaginale fino all'osservazione delle prime cellule cheratinizzate, in modo da poter determinare l'intervallo di tempo tra i due eventi. Occorre anche monitorare per due settimane i cicli estrali di tutte le femmine F_1 della coorte 1A, a partire all'incirca dal PND 75. Inoltre, se è necessario fare accoppiare la generazione F_1 , la citologia vaginale della femmine della coorte 1B sarà eseguita a partire dalla formazione delle coppie finché la popolazione sarà comprovata.

Accoppiamento e gravidanza

42. Oltre agli endpoint standard (ad esempio: peso corporeo, assunzione di cibo, osservazioni cliniche che comprendono i controlli sulla mortalità/morbilità), vengono registrate anche le date dell'accoppiamento, dell'inseminazione e del parto; vengono inoltre calcolati l'intervallo precoitale (dalla formazione delle coppie all'inseminazione) e la durata della gestazione (dall'inseminazione al parto). Le femmine P vanno esaminate con attenzione al momento previsto per il parto, per rilevare eventuali sintomi di distocia. Occorre registrare ogni anomalia nel comportamento di nidificazione o allattamento.
43. Il giorno in cui avviene il parto corrisponde, per la madre, al giorno 0 dell'allattamento (DL 0) e, per la progenie, al giorno 0 dalla nascita (PND 0). In alternativa, è possibile contare i giorni a partire dalla copulazione per evitare errori nei dati sullo sviluppo postnatale dovuti alle differenze nella durata della gestazione; è tuttavia necessario contare i giorni anche a partire dal parto: ciò è particolarmente importante quando la sostanza in esame influenza la durata della gestazione.

Parametri relativi alla progenie

44. Ciascuna nidiata va esaminata non appena possibile dopo il parto (PND 0 oppure 1) per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, gli individui nati morti e quelli nati vivi, e individuare eventuali anomalie macroscopiche (anomalie visibili, che includono: palatoschisi, emorragie sottocutanee, anomalie nel colore o nella struttura della pelle, presenza del cordone ombelicale, assenza di latte nello stomaco, presenza di secrezioni secche). Inoltre, il primo esame clinico dei neonati deve comprendere una valutazione qualitativa della temperatura corporea, dello stato di attività e della reazione alle manipolazioni. I piccoli trovati morti il PND 0 o successivamente vanno esaminati alla ricerca di possibili difetti e della causa del decesso. I piccoli vivi sono contati e pesati individualmente il PND 0 oppure 1, e successivamente a intervalli periodici; ad esempio: PND 4, 7, 14 e 21. Gli esami clinici, che dipendono dall'età degli animali, vanno ripetuti ogni volta che la progenie viene pesata, o più spesso

se sono stati rilevati casi specifici alla nascita. I segni da sorvegliare possono includere (la lista non è esaustiva): anomalie esterne, alterazioni a livello della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, comparsa di secrezioni ed escrezioni, attività autonoma. Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti tonici o clonici, stereotipie e qualsiasi comportamento insolito.

45. Occorre misurare almeno una volta la distanza anogenitale (AGD) di ogni piccolo, tra il PND 0 e il PND 4. Il peso corporeo del piccolo va registrato quando ne viene misurata l'AGD, che viene normalizzata in funzione della taglia, preferibilmente usando la radice cubica del peso corporeo (12). Va controllata la presenza di capezzoli/areole nei piccoli di sesso maschile al PND 12 o 13.
46. In tutti gli animali F₁ selezionati viene valutata quotidianamente la presenza di separazione balano-prepuziale, nei maschi, e apertura vaginale, nelle femmine, a cominciare da prima della data prevista per la comparsa di tali endpoint, in modo da verificare l'insorgere prematuro della maturazione sessuale. Occorre registrare eventuali anomalie degli organi genitali, quali persistente filamento vaginale, ipospadia o pene bifido. La maturità sessuale degli animali F₁ va confrontata con lo sviluppo fisico, determinando età e peso corporeo al momento dell'apertura vaginale o della separazione balano-prepuziale, nelle femmine e nei maschi rispettivamente (13).

Valutazione della potenziale neurotossicità per lo sviluppo (coorti 2A e 2B)

47. Per la valutazione della neurotossicità occorre utilizzare esemplari delle coorti 2A e 2B, con dieci maschi e dieci femmine per ciascuna coorte e per ciascun gruppo di trattamento (per ogni coorte: 1 maschio o una femmina per nidata; tutte le nidate rappresentate da almeno un piccolo; selezione casuale). Gli animali della coorte 2A vengono sottoposti a una serie di osservazioni funzionali, alla valutazione del riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro e dell'attività motoria (cfr. paragrafi 48-50) e a una valutazione neuropatologica (cfr. paragrafi 74-75). Si cercherà in particolar modo di ridurre al minimo le variazioni che influenzano le condizioni di prova assicurandosi che non siano legate sistematicamente al trattamento. Tra le variabili che possono incidere sul comportamento figurano il livello sonoro (ad esempio il rumore intermittente), la temperatura, l'umidità, l'illuminazione, gli odori, l'ora del giorno, e le distrazioni legate all'ambiente. I risultati delle prove di neurotossicità vanno interpretati in relazione ad adeguati range di riferimento con controlli storici. La valutazione neuropatologica degli animali della coorte 2B va svolta al PND 21 o 22 (cfr. paragrafi 74-75).
48. Al PND 24 (± 1 giorno) va condotto un test per il riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro sugli animali della coorte 2A. La valutazione dei gruppi trattati e di controllo è ripartita in modo equilibrato nel corso della giornata. Ciascuna sessione comprende 50 prove. Per questo tipo di test auditivo, va calcolata l'ampiezza della risposta media su ciascun blocco di 10 prove (5 blocchi di 10 prove ciascuno), ottimizzando le condizioni per permettere un periodo di adattamento intra-sessione. Questi protocolli devono essere conformi al metodo di prova B.53 (35).
49. Tra il PND 63 e il PND 75, si sceglierà il momento opportuno per svolgere una serie di osservazioni funzionali sugli animali della coorte 2A, nonché una prova automatizzata concernente l'attività motoria. Questi protocolli devono essere conformi ai metodi di prova B.43 (33) e B.53 (35). La serie di osservazioni funzionali comprende una descrizione approfondita dell'aspetto, del comportamento e dell'integrità funzionale dei soggetti. La descrizione si basa sull'osservazione dei soggetti prima nelle gabbie di stabulazione e poi in un apposito recinto standard di osservazione (campo aperto) dove l'animale è libero di muoversi, nonché su prove di manipolazione. Le prove saranno svolte per ordine crescente di interattività. Un elenco delle misure è presentato nell'appendice 1. Tutti gli animali sono esaminati attentamente da osservatori preparati che ignorano il trattamento ricevuto dagli animali, secondo protocolli standardizzati che riducono al minimo la variabilità dipendente dall'osservatore. Ove possibile, è consigliabile che sia il medesimo osservatore a valutare tutti gli animali in una stessa prova. Se ciò non fosse possibile, è necessario dimostrare l'affidabilità tra gli osservatori. Per ciascun parametro della batteria di test comportamentali occorre utilizzare scale di punteggi e criteri di valutazione il cui modo operativo sia esplicitamente definito. Se possibile, vanno stabilite misure quantitative oggettive per le osservazioni che implicano un punteggio soggettivo. Per quanto riguarda l'attività motoria, ogni animale è sottoposto a prova individuale. La sessione di prova deve essere sufficientemente lunga da consentire di dimostrare l'adattamento intra-sessione degli animali di controllo. L'attività motoria va monitorata tramite un apparecchio automatico che la registra, in grado di rilevarne sia l'aumento che la diminuzione (ciò vuol dire che il livello dell'attività di partenza misurata dall'apparecchio non deve essere così basso da escludere la possibilità di rilevarne la diminuzione, né così alto da impedire di rilevarne l'aumento). Tutti gli apparecchi vengono tarati secondo protocolli standard per assicurare, nella misura del possibile, l'affidabilità delle operazioni svolte da dispositivi diversi in giorni diversi. Nella misura del possibile, occorre bilanciare i diversi gruppi di trattamento destinati ai diversi dispositivi. I gruppi di trattamento vanno ripartiti sull'arco della giornata per tener conto dei ritmi circadiani di attività.
50. Se le informazioni esistenti segnalano la necessità di svolgere altre prove funzionali (ad esempio sensoriali, sociali, cognitive), queste ultime andranno integrate nel protocollo senza compromettere l'integrità delle altre valutazioni previste. Se vengono svolte ulteriori prove sugli stessi animali utilizzati per il test sul riflesso di trasalimento, per

la serie di osservazioni funzionali o per le prove sull'attività motoria, occorre programmarle in modo tale da ridurre al minimo il rischio di compromettere l'integrità delle prime. Quando l'osservazione empirica, gli effetti previsti o diversi aspetti legati al meccanismo o alla modalità d'azione suggeriscono un tipo specifico di neurotossicità, possono rivelarsi particolarmente utili dei protocolli supplementari.

Valutazione del potenziale di immunotossicità per lo sviluppo (coorte 3)

51. Al PND 56 (\pm 3 giorni), 10 maschi e 10 femmine della coorte 3 per ogni gruppo di trattamento (1 maschio e 1 femmina per nidiata; tutte le nidiate rappresentate da almeno 1 piccolo; selezione casuale) saranno sottoposti a una prova di risposta anticorpale T-dipendente, per cercare anticorpi IgM prodotti nel corso della risposta primaria a un antigene dipendente dai linfociti T, per esempio gli eritrociti di pecora (*Sheep Red Blood Cells*, SRBC) o l'emocianina di patella (*Keyhole Limpet Hemocyanin*, KLH); queste prove devono essere conformi agli attuali protocolli sperimentali dell'immunotossicità (14) (15). La risposta può essere valutata contando il numero specifico di cellule che formano placche (PFC) nella milza o determinando il titolo di anticorpi IgM specifici per SRBC o KLH nel siero con la prova ELISA, al picco della risposta. In generale tale picco si raggiunge dopo quattro (conteggio PFC) o cinque (ELISA) giorni dall'immunizzazione per via endovenosa. Se la risposta primaria degli anticorpi viene valutata tramite conteggio delle PFC, è possibile suddividere gli animali in sottogruppi valutati in giorni diversi, alle seguenti condizioni: l'intervallo tra l'immunizzazione e la soppressione di un sottogruppo deve essere stabilito in modo che le PFC siano conteggiate al picco della risposta; i sottogruppi devono contenere uno stesso numero di discendenti maschi e femmine provenienti da tutti i gruppi-dose, compresi i controlli; i sottogruppi devono essere valutati all'incirca alla stessa età postnatale. L'esposizione alla sostanza in esame continuerà fino al giorno prima di raccogliere le milze per la risposta PFC o il siero con il metodo ELISA.

Valutazione ulteriore del potenziale di tossicità per la riproduzione (coorte 1B)

52. È possibile continuare a somministrare il trattamento agli animali della coorte 1B al di là del PND 90, continuando ad allevarli per ottenere una generazione F₂ se necessario. I maschi e le femmine appartenenti a uno stesso gruppo-dose possono coabitare (evitando che si formino coppie di individui della stessa nidiata) per altre due settimane a partire dal PND 90 ma non oltre il PND 120. I protocolli saranno simili a quelli previsti per gli animali P. Tuttavia, basandosi sul peso dell'evidenza, può essere sufficiente sopprimere le nidiate al PND 4 invece che valutarle sino allo svezzamento od oltre.

OSSERVAZIONI FINALI

Biochimica clinica/Ematologia

53. Occorre sorvegliare gli effetti sistemici negli animali P. Vengono prelevati, a digiuno, campioni di sangue da un sito specifico in dieci maschi e dieci femmine P per gruppo-dose, selezionati casualmente al momento della soppressione; i campioni vengono conservati in condizioni adeguate e sono sottoposti a esame ematologico parziale o completo, a un esame biochimico clinico, a un dosaggio di T4 e TSH, o ad altri esami suggeriti dalla conoscenza del profilo degli effetti della sostanza in esame [cfr. documento di orientamento OCSE n. 151 (40)]. Occorre valutare i seguenti parametri ematologici: ematocrito, concentrazione di emoglobina, conteggio degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, numero di piastrine e misura del tempo e del potenziale di coagulazione. Le analisi del plasma o del siero comprenderanno il glucosio, il colesterolo totale, l'urea, la creatinina, le proteine totali, l'albumina e almeno due enzimi indicatori degli effetti epatocellulari (come l'alanina aminotransferasi, l'aspartato aminotransferasi, la fosfatasi alcalina, la gamma-glutamyl transpeptidasi e la sorbitolo deidrogenasi). In alcuni casi, il dosaggio di enzimi supplementari e degli acidi biliari può fornire indicazioni utili. Inoltre, è possibile conservare prelievi di sangue da tutti gli animali in vista di ulteriori analisi destinate a chiarire in un secondo tempo gli effetti ambigui o per generare dati interni sull'esposizione. Se non si intende procedere a un secondo accoppiamento di animali P, i campioni sono prelevati al momento della soppressione o nel periodo immediatamente precedente. Se gli animali sono mantenuti in vita, si deve procedere ai prelievi pochi giorni prima del secondo accoppiamento. Inoltre, a meno che precedenti studi a dose ripetuta indichino che la sostanza in esame non influisce su questo parametro, occorre procedere a un'analisi delle urine prima della soppressione, valutando i seguenti elementi: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio, sangue e cellule ematiche, detriti cellulari. Possono essere prelevati campioni di urine anche per monitorare l'escrezione della sostanza in esame e/o di metaboliti.
54. Gli effetti sistemici devono essere monitorati anche negli animali F₁. Al momento della soppressione vengono prelevati, a digiuno, campioni di sangue da un sito specifico in dieci maschi e dieci femmine selezionati casualmente per ciascun gruppo-dose nella coorte 1A; i campioni sono conservati in condizioni adeguate e sottoposti a un esame biochimico clinico standard, compresa la valutazione della concentrazione sierica per gli ormoni tiroidei (T4 e TSH), un esame ematologico (conteggio totale e differenziato dei leucociti, conteggio degli eritrociti) e analisi delle urine.

55. I piccoli in eccedenza al PND 4 sono sottoposti ad autopsia macroscopica nel corso della quale è possibile valutare la concentrazione sierica degli ormoni tiroidei (T4). Se necessario, i campioni di sangue dei neonati (PND 4) possono essere raggruppati per nidata per svolgere analisi biochimiche e sul dosaggio degli ormoni tiroidei. Campioni di sangue sono prelevati anche dai soggetti appena svezzati sottoposti ad autopsia macroscopica il PND 22 (piccoli F₁ non selezionati per una coorte) al fine di analizzare la T4 e la TSH.

Parametri relativi allo sperma

56. I parametri relativi allo sperma vanno misurati in tutti i maschi della generazione P, a meno che non vi siano dati esistenti che dimostrino che tali parametri non subiscono modifiche nel corso di uno studio su 90 giorni. L'esame dei parametri dello sperma va effettuato su tutti i maschi della coorte 1A.
57. Al momento della soppressione, il peso dei testicoli e degli epididimi va registrato per tutti i maschi P e F₁ (coorte 1A). Occorre conservare almeno un testicolo e un epididimo per l'esame istopatologico. L'epididimo rimasto serve a contare le riserve di spermatozoi nella coda dell'epididimo (16) (17). Inoltre, gli spermatozoi della coda dell'epididimo (o del dotto deferente) vengono raccolti con modalità tali da ridurre al minimo i danni per la valutazione della loro motilità e morfologia (18).
58. La motilità degli spermatozoi viene valutata subito dopo la soppressione oppure videoregistrata per un'analisi successiva. La percentuale di spermatozoi progressivamente mobili può essere determinata soggettivamente od oggettivamente attraverso un'analisi computerizzata del movimento (19) (20) (21) (22) (23) (24). Per valutare la morfologia degli spermatozoi si esaminano campioni di sperma prelevato nell'epididimo (o nel dotto deferente) in preparazioni fissate o umide (25); almeno 200 spermatozoi per campione vengono classificati come normali (se sia la testa che la parte centrale/coda appaiono normali) o anomali. Esempi di anomalie morfologiche degli spermatozoi: fusione, teste isolate e deformazioni di testa e/o coda (26). Teste deformate o larghe possono indicare anomalie nella spermiazione.
59. Se i campioni di sperma vengono congelati, gli strisci fissati e le immagini della motilità degli spermatozoi registrate al momento dell'autopsia (27), le ulteriori analisi possono limitarsi ai maschi ai quali sono state somministrate dosi elevate e ai maschi di controllo. Tuttavia, se si osservano effetti dovuti al trattamento occorre valutare anche i gruppi trattati con dosi inferiori.

Autopsia macroscopica

60. Subito dopo la soppressione o il decesso nel corso dello studio, tutti gli animali P e F₁ sono sottoposti ad autopsia macroscopica alla ricerca di eventuali anomalie strutturali o alterazioni patologiche. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttore. I piccoli moribondi che vengono soppressi con metodi non cruenti e i piccoli deceduti vanno registrati e, quando non macerati, vanno esaminati alla ricerca di possibili difetti e/o della causa del decesso e successivamente conservati.
61. Uno striscio vaginale delle femmine adulte P e F₁ viene esaminato il giorno dell'autopsia per determinare lo stadio del ciclo estrale e consentire di stabilire correlazioni con l'istopatologia degli organi riproduttivi. Occorre esaminare gli uteri di tutte le femmine P (e femmine F₁, se applicabile) senza compromettere l'esame istopatologico, per verificare la presenza di siti di impianto e conteggiarli.

Pesatura degli organi e conservazione dei tessuti — Animali adulti P e F₁

62. A soppressione avvenuta e non appena ciò sia possibile dopo la dissezione (per evitare l'essiccamento), vengono determinati il peso corporeo e il peso umido degli organi di seguito elencati di tutti gli animali P e degli adulti F₁ delle coorti pertinenti (cfr. in appresso). Gli organi vanno in seguito conservati in condizioni adeguate. Se non altrimenti specificato, gli organi a coppie possono essere pesati individualmente o insieme, a seconda della prassi vigente nel laboratorio.

— Utero (con ovidotti e collo dell'utero), ovaie.

— Testicoli, epididimi (totalità e coda per i campioni usati nella conta spermatica).

— Prostata (insieme delle porzioni dorsolaterali e ventrali). Occorre prelevare con cautela l'insieme della prostata in modo da evitare di perforare le vescicole seminali piene di liquido. Se il trattamento ha inciso sul peso totale della prostata, occorre procedere cautamente alla dissezione delle porzioni dorsolaterali e ventrali, che vanno pesate separatamente previa fissazione.

- Vescicole seminali con ghiandole della coagulazione e relativi liquidi (come un'unica unità).
 - Cervello, cuore, fegato, reni, milza, timo, ipofisi, tiroide (previa fissazione), ghiandole surrenali e organi o tessuti bersaglio conosciuti.
63. Oltre agli organi elencati sopra, occorre conservare, in condizioni adeguate: campioni di nervo periferico, muscolo, midollo spinale, occhio più nervo ottico, tratto gastrointestinale, vescica, polmone, trachea (con tiroide e paratiroidi), midollo osseo, dotto deferente (maschi), ghiandola mammaria (maschi e femmine) e vagina.
64. Gli organi degli animali della coorte 1A vengono tutti pesati e conservati per l'esame istopatologico.
65. Per valutare gli effetti immunotossici indotti pre- e post-nascita, al momento della soppressione occorre sottoporre 10 maschi e 10 femmine della coorte 1A per ciascun gruppo di trattamento (un maschio e una femmina per nidiata; ogni nidiata rappresentata da almeno un piccolo; selezione casuale) agli esami elencati di seguito:
- pesatura dei linfonodi sia associati alla via di esposizione sia distanti da essa (oltre alla pesatura di ghiandole surrenali, timo e milza, già svolta per tutti gli animali della coorte 1A);
 - analisi delle sottopopolazioni linfocitarie spleniche (linfociti T CD4+ e CD8+, linfociti B, e cellule natural killer NK) usando una metà della milza; l'altra metà della milza va conservata per l'esame istopatologico.
- L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie spleniche in animali non immunizzati (coorte 1A) stabilirà se l'esposizione contribuisce a un cambiamento dell'equilibrio immunologico relativo alla distribuzione dei linfociti timici ausiliari (CD 4+) o citotossici (CD 8+) o delle cellule NK (risposte rapide alle cellule neoplastiche e ai patogeni).
66. Occorre pesare gli organi elencati di seguito degli animali della coorte 1B e trattare i relativi tessuti fino alla trasformazione in blocchi:
- vagina (non pesata)
 - utero, collo dell'utero compreso
 - ovaie
 - testicoli (almeno uno)
 - epididimi
 - vescicole seminali e ghiandole della coagulazione
 - prostata
 - ipofisi
 - organi bersaglio conosciuti

Si procederà a svolgere l'esame istopatologico della coorte 1B solo se i risultati della coorte 1A sono ambigui o se si sospetta che la sostanza somministrata sia tossica per la riproduzione o per il sistema endocrino.

67. Coorti 2A e 2B: prova di neurotossicità nella fase dello sviluppo (PND 21 o 22 e discendenti adulti). Gli animali della coorte 2A sono soppressi dopo le prove comportamentali, il loro cervello viene pesato e sottoposto a un esame istopatologico completo per una valutazione della neurotossicità. Gli animali della coorte 2B vengono soppressi il PND 21 o 22, il loro cervello viene pesato e in seguito sottoposto a esame microscopico per una valutazione della neurotossicità. La fissazione per perfusione è indispensabile per gli animali della coorte 2A mentre è facoltativa per quelli della coorte 2B, conformemente al metodo di prova B.53 (35).

Pesatura degli organi e conservazione dei tessuti — Animali appena svezzati F₁

68. I piccoli non selezionati per le diverse coorti, inclusi quelli più piccoli del normale, vengono soppressi non appena svezzati (PND 22), tranne quando i risultati indicano che è necessario procedere ad altri esami in vivo. I piccoli soppressi sono sottoposti ad autopsia macroscopica, compresa una valutazione degli organi riproduttivi, come descritto ai paragrafi 62 e 63. Cervello, milza e timo vanno pesati e conservati in condizioni adeguate per un massimo di 10 piccoli per sesso e per gruppo, provenienti dal maggior numero possibile di nidiata. Inoltre, i tessuti mammari di questi piccoli, femmine e maschi, possono essere conservati per un'ulteriore analisi microscopica ⁽¹⁾ [cfr. documento di orientamento OCSE n. 151 (40)]. Vanno inoltre conservati i tessuti bersaglio ed eventuali anomalie macroscopiche, per un eventuale esame istologico.

⁽¹⁾ La ricerca ha dimostrato che la ghiandola mammaria, soprattutto nei primi stadi di vita, è un endpoint sensibile per le sostanze con attività estrogenica. Si raccomanda quindi di includere nel presente metodo di prova, previa validazione, degli endpoint basati sulle ghiandole mammarie dei piccoli di entrambi i sessi.

Istopatologia — Animali P

69. Occorre svolgere un esame istopatologico completo degli organi elencati ai paragrafi 62 e 63 su tutti gli animali P di controllo e del gruppo di trattamento a dose elevata. È inoltre opportuno esaminare gli organi di tutti gli animali ai quali sono state somministrate dosi inferiori e che evidenziano alterazioni imputabili alla sostanza in esame, al fine di determinare il NOAEL. Inoltre, vanno sottoposti a esame istopatologico gli organi riproduttivi e tutte le lesioni macroscopiche di tutti gli animali nei quali si sospetta una riduzione della fertilità, ad esempio gli esemplari che non si sono accoppiati, non hanno concepito, non hanno generato o non hanno partorito prole sana, o nei quali si sono osservati effetti sul ciclo estrale o sul numero, sulla motilità o sulla morfologia degli spermatozoi.

Istopatologia — animali F₁

Animali della coorte 1

70. È necessario svolgere un esame istopatologico completo degli organi elencati ai paragrafi 62 e 63 degli animali di controllo o ai quali è stata somministrata una dose elevata della coorte 1A. Tutte le nidiate devono essere rappresentate da almeno 1 piccolo per sesso. È inoltre opportuno esaminare gli organi e i tessuti che evidenziano alterazioni imputabili al trattamento, nonché tutte le lesioni macroscopiche, presso tutti gli animali ai quali sono state somministrate dosi inferiori, al fine di determinare un NOAEL. La valutazione degli effetti pre- e postnatali sugli organi linfatici richiede anche un esame istopatologico dei linfonodi e del midollo osseo da svolgere su 10 maschi e 10 femmine della coorte 1A, che si affianca all'esame istopatologico del timo, della milza e delle ghiandole surrenali già eseguito su tutti gli animali 1A.
71. I tessuti riproduttivi ed endocrini della totalità degli individui della coorte 1B trattati fino alla trasformazione in blocchi (come descritto al paragrafo 66) vanno sottoposti ad esame istopatologico in caso di agenti sospettati di essere tossici per la riproduzione o per il sistema endocrino. Occorre sottoporre anche la coorte 1B ad esame istologico se i risultati della coorte 1A sono ambigui.
72. Le ovaie delle femmine adulte devono contenere follicoli primordiali e in crescita, nonché corpi lutei; pertanto, occorre svolgere un esame istopatologico delle femmine F₁ per quantificare follicoli primordiali, piccoli follicoli in crescita, nonché corpi lutei; il numero di animali, la selezione delle sezioni ovariche e le dimensioni dei campioni devono essere statisticamente adeguati al protocollo di analisi applicato. È possibile procedere alla conta dei follicoli in primo luogo negli animali di controllo e in quelli trattati con dose elevata; in caso di effetti nocivi in questi ultimi, occorre esaminare anche gli animali trattati con dosi inferiori. L'esame deve comprendere la conta del numero dei follicoli primordiali, che può essere combinata con i follicoli piccoli in crescita per il confronto tra le ovaie dei soggetti trattati e dei controlli [cfr. documento di orientamento OCSE n. 151 (40)]. La valutazione dei corpi lutei va effettuata in parallelo con le prove sulla ciclicità estrale, in modo da poter prendere in considerazione la fase del ciclo. Va valutato se lo sviluppo specifico degli ovidotti, dell'utero e della vagina rientra nella norma.
73. Si svolgeranno esami istopatologici testicolari approfonditi sui maschi F₁, per identificare effetti imputabili al trattamento sulla differenziazione e sullo sviluppo dei testicoli nonché sulla spermatogenesi (38). Se possibile, esaminare sezioni di *rete testis*. Va verificato che lo sviluppo specifico per testa, corpo e coda dell'epididimio e per il dotto deferente sia nella norma, e vanno valutati i parametri necessari per i maschi P.

Animali della coorte 2

74. È necessario svolgere un esame neuroistopatologico su tutti gli animali di controllo e del gruppo di trattamento a dose elevata della coorte 2A, per sesso, subito dopo i test neurocomportamentali (dopo il PND 75, ma non oltre il PND 90). Al PDN 21 o 22 occorre svolgere un esame istopatologico del cervello su tutti gli animali di controllo e del gruppo di trattamento a dose elevata della coorte 2B, per sesso. È inoltre opportuno esaminare gli organi o i tessuti di tutti gli animali ai quali sono state somministrate dosi inferiori e che evidenziano alterazioni imputabili alla sostanza in esame, al fine di determinare il NOAEL. Per gli animali delle coorti 2A e 2B, si esaminano molteplici sezioni del cervello per permettere la valutazione di bulbi olfattivi, corteccia cerebrale, ippocampo, gangli basali, talamo, ipotalamo, mesencefalo (tetto, tegmento e peduncoli cerebrali), midollo allungato e cervelletto. Solo per la coorte 2A, si esaminano occhi (retina e nervo ottico) e campioni del nervo periferico, del muscolo e del midollo spinale. Questi protocolli neuroistologici devono essere conformi al metodo di prova B.53 (35).
75. Parti rappresentative del cervello (sezioni omologhe attentamente selezionate in base a indicatori microscopici affidabili) vengono sottoposte a un esame morfometrico (quantitativo), che può comprendere misure lineari e/o della superficie di specifiche regioni del cervello. Si effettueranno almeno tre sezioni consecutive per ciascun indicatore morfologico (livello) in modo da poter scegliere le più omologhe e rappresentative per l'area specifica del cervello da valutare. Il neuropatologo deciderà se le sezioni preparate per essere misurate sono omologhe agli altri

campioni raccolti e se sono dunque adatte ad essere misurate, in quanto le misure lineari, in modo particolare, possono variare su distanze relativamente brevi (28). Le sezioni non omologhe vanno escluse. Sebbene l'obiettivo sia il prelievo di campioni da tutti gli animali selezionati a questo scopo (10/sexso/livello di dose), è accettabile ricorrere a un numero inferiore di campioni. Tuttavia i prelievi da meno di 6 animali/sexso/livello di dose non sono in genere ritenuti sufficienti ai fini del presente metodo di prova. Il ricorso alla stereologia è utile per identificare gli effetti riconducibili al trattamento su parametri quali il volume o il numero di cellule di specifiche regioni neuroanatomiche. Tutti gli aspetti della preparazione dei campioni tissutali — dalla fissazione dei tessuti alla dissezione dei campioni di tessuto, al trattamento dei tessuti, alla colorazione dei vetrini — devono seguire un modello sperimentale equilibrato, che preveda per ciascun lotto una quantità di campioni rappresentativi di ogni gruppo-dose. Quando è necessario svolgere analisi morfometriche o stereologiche, occorre includere simultaneamente il tessuto cerebrale in mezzi adatti per tutti i livelli di dose, per evitare la coartazione, artefatto che può insorgere durante la conservazione prolungata nel fissativo.

RELAZIONI

Dati

76. I dati devono essere riportati individualmente e riassunti sotto forma di tabella. Ove pertinente, vengono presentate le seguenti informazioni per ciascun gruppo di prova e ciascuna generazione: il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti nel corso della prova o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso/eutanasia, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di femmine che hanno partorito una nidiate e il numero di animali che presentano segni di tossicità. La relazione deve inoltre contenere una descrizione della tossicità, compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità.
77. È necessario valutare i risultati numerici mediante un metodo statistico adeguato e riconosciuto. I metodi statistici sono parte integrante del modello sperimentale; devono trattare in modo pertinente i dati non normali (ad esempio i risultati delle conte), i dati censurati (ad esempio a causa di un tempo di osservazione limitato), la non-indipendenza (ad esempio gli effetti sulle nidiate e le misurazioni ripetute) e le varianze ineguali. I modelli lineari generalizzati misti e i modelli dose-risposta coprono un largo ventaglio di strumenti di analisi che possono essere adatti a trattare i dati ottenuti nel quadro di questo metodo di prova. La relazione deve comprendere sufficienti informazioni sul metodo di analisi e sul programma informatico utilizzati, in modo da consentire a un revisore o a un esperto di statistica indipendente di valutare/rivalutare l'analisi.

Valutazione dei risultati

78. I reperti vanno valutati in base agli effetti osservati, ivi compreso in sede di autopsia e all'esame microscopico. La valutazione include il rapporto, o l'assenza di rapporto, tra dose e presenza, incidenza e gravità delle anomalie, comprese le lesioni macroscopiche. Vanno inoltre valutati gli organi bersaglio, la fertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva e le nidiate, le variazioni del peso corporeo, la mortalità e qualsiasi altro effetto tossico e sullo sviluppo. Occorre prestare particolare attenzione alle alterazioni specifiche a ciascun sesso. Nella valutazione dei risultati della prova occorre tenere conto delle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame e, quando disponibili, dei dati tossicocinetici, inclusi il trasferimento placentare e l'escrezione nel latte.

Relazione sulla prova

79. La relazione deve comprendere le seguenti informazioni, ottenute tramite il presente studio condotto su animali P, F₁ e F₂ (ove pertinente).

Sostanza chimica in esame:

- tutte le informazioni pertinenti disponibili sulla sostanza in esame, le sue proprietà chimiche, tossicocinetiche e tossicodinamiche;
- dati identificativi;
- purezza.

Mezzo disperdente (se del caso):

- giustificazione per la scelta del mezzo disperdente utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

- specie/ceppo utilizzato;
- numero, età e sesso degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, materiali per la preparazione del nido ecc.;
- peso di ciascun animale all'inizio della prova;
- risultati dello striscio vaginale delle femmine P prima dell'inizio del trattamento (se i dati sono raccolti in quel particolare momento);
- le registrazioni sulla formazione di coppie della generazione P, che precisano il partner di sesso maschile e di sesso femminile e se l'accoppiamento è riuscito;
- nidiata d'origine degli animali adulti della generazione F₁.

Condizioni sperimentali:

- criteri di selezione dei livelli di dose;
- dettagli su formulazione della sostanza chimica in esame/preparazione della dieta, concentrazioni ottenute;
- stabilità e omogeneità della preparazione nel mezzo disperdente o nel vettore (ad esempio cibo, acqua da bere), nel sangue e/o nel latte alle condizioni d'uso e magazzinaggio tra le utilizzazioni;
- modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;
- se del caso, equivalenza tra la concentrazione della sostanza nella dieta/nell'acqua da bere (espressa in ppm) e la dose somministrata (mg/kg di peso corporeo/giorno);
- dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresa la composizione della dieta, se disponibile);
- descrizione dettagliata dei protocolli di randomizzazione utilizzati per selezionare i piccoli da sopprimere e per assegnare quelli restanti ai gruppi sottoposti a prova;
- condizioni ambientali;
- elenco delle persone che hanno partecipato allo studio, specificandone la formazione professionale.

Risultati (sintesi e dati individuali per sesso e per dose):

- consumo di cibo, consumo di acqua (se disponibile), efficienza alimentare (incremento ponderale per grammo di alimenti consumati, tranne che per il periodo di coabitazione e durante la lattazione), e consumo della sostanza in esame (somministrazione attraverso dieta/acqua da bere) per gli animali P e F₁;
- dati sull'assorbimento (se disponibili);
- dati sul peso corporeo degli animali P;
- dati sul peso corporeo dopo lo svezzamento per gli animali F₁ selezionati;
- momento del decesso durante lo studio o indicazione sulla sopravvivenza degli animali alla conclusione della prova;
- natura, gravità e durata dei segni clinici (sia reversibili che non reversibili);
- risultati delle analisi ematologiche, delle urine e di biochimica clinica, compreso il dosaggio di TSH e T4;
- analisi fenotipiche di cellule di milza (cellule T, B, NK);
- cellularità del midollo osseo;
- dati sulla risposta tossica;
- numero di femmine P e F₁ con ciclo estrale normale o anormale e durata del ciclo;
- tempo per l'accoppiamento (intervallo precoitale, numero di giorni tra formazione delle coppie e accoppiamento);
- effetti tossici o altri effetti sulla riproduzione, compreso il numero e la percentuale di animali che riescono ad accoppiarsi, ad essere gravide, a partorire e ad allattare, di maschi che provocano gravidanze, di femmine che presentano segni di distocia/parto prolungato o difficile;
- durata della gestazione e, se disponibile, del parto;
- numero di impianti, dimensioni della nidiata e percentuale di piccoli di sesso maschile;

- numero e percentuale di perdite post-impianto, di nati vivi e di nati morti;
- peso della nidiata e peso dei piccoli (dei maschi, delle femmine, e dell'insieme dei due sessi), numero di esemplari più piccoli del normale, se determinato;
- numero di piccoli con anomalie evidenti;
- effetti tossici o altri effetti sulla progenie, sulla crescita postnatale, sulla sopravvivenza ecc.;
- osservazioni sugli indicatori fisici nei piccoli e altri dati sullo sviluppo post-natale;
- dati sulla maturazione sessuale degli animali F_1 ;
- osservazioni funzionali condotte, secondo la necessità, su piccoli e adulti;
- peso corporeo al momento della soppressione degli animali e dati sul peso assoluto e relativo degli organi negli animali P e negli adulti F_1 ;
- reperti autoptici;
- descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici;
- numero totale degli spermatozoi nella coda dell'epididimo, percentuale di spermatozoi progressivamente mobili, percentuale di spermatozoi morfologicamente normali e percentuale di spermatozoi con ciascuna delle anomalie identificate per i maschi P e F_1 ,
- se del caso, numero e fase di maturazione dei follicoli contenuti nelle ovaie delle femmine P e F_1 ;
- conta dei corpi lutei nelle ovaie delle femmine F_1 ;
- elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Parametri della coorte 2

- descrizione dettagliata dei protocolli utilizzati per standardizzare le osservazioni, e descrizione dei protocolli e delle definizioni operative impiegate per classificare le osservazioni;
- elenco di tutti i protocolli sperimentali utilizzati e giustificazione della loro scelta;
- descrizione particolareggiata dei protocolli comportamentali/funzionali, neuropatologici e morfometrici utilizzati, comprese informazioni e dettagli sugli apparecchi automatici di rilevamento;
- protocolli per tarare e garantire l'equivalenza degli apparecchi e per garantire la composizione equilibrata dei gruppi di trattamento nelle prove;
- breve motivazione delle decisioni basate su un giudizio professionale;
- descrizione dettagliata di tutte le osservazioni comportamentali, funzionali, neuropatologiche e morfometriche per sesso e gruppo-dose, compresi gli incrementi e i decrementi rispetto ai controlli;
- peso del cervello;
- ogni diagnosi formulata alla luce di lesioni e segni neurologici, ivi comprese malattie o condizioni d'insorgenza naturale;
- immagini di reperti emblematici;
- immagini a debole ingrandimento che consentono di valutare l'omologia delle sezioni utilizzate per la morfometria;
- elaborazione statistica dei risultati, compresi i modelli statistici utilizzati per l'analisi dei dati, e i risultati, indipendentemente dal fatto che siano significativi;
- legame tra eventuali altri effetti tossici e le conclusioni circa il potenziale neurotossico della sostanza chimica in esame, per sesso e gruppo-dose;
- riperussioni delle eventuali informazioni tossicocinetiche sulle conclusioni;
- dati a sostegno dell'attendibilità e della sensibilità del metodo di prova (vale a dire, dati storici di controllo e dati di controllo positivi);
- relazione, se esistente, tra gli effetti neuropatologici e funzionali;
- NOAEL o dose di riferimento per madri e figli, per sesso e gruppo;
- discussione sull'interpretazione generale dei dati basata sui risultati, che espliciti la conclusione a cui si è giunti, ossia se la sostanza chimica esaminata abbia causato o meno neurotossicità nella fase dello sviluppo, con relativo NOAEL.

- concentrazione sierica degli anticorpi IgM (sensibilizzazione con SRBC o KLH), o numero di PFC nella milza in risposta agli IgM (sensibilizzazione con SRBC);
- l'esecuzione della prova di risposta anticorpale T-dipendente (TDAR) va confermata nell'ambito del processo di ottimizzazione dal laboratorio che l'allestisce per la prima volta e in seguito periodicamente (per esempio una volta all'anno) da parte di tutti i laboratori;
- discussione sull'interpretazione generale dei dati basata sui risultati, che espliciti la conclusione a cui si è giunti, ossia se la sostanza chimica esaminata abbia causato o meno immunotossicità nella fase dello sviluppo, con relativo NOAEL.

Discussione dei risultati

Conclusioni, compresi i valori NOAEL per gli effetti sugli animali parentali e sulla progenie

Vanno fornite tutte le informazioni non ottenute durante lo studio ma utili per l'interpretazione dei risultati (ad esempio, eventuali analogie con effetti dovuti a sostanze neurotossiche note).

Interpretazione dei risultati

80. Uno studio esteso della tossicità per la riproduzione su una generazione fornirà informazioni sugli effetti dovuti all'esposizione ripetuta ad una sostanza durante tutte le fasi del ciclo riproduttivo, se del caso. In particolare, lo studio fornisce informazioni sull'apparato riproduttivo nonché sullo sviluppo, la crescita, la sopravvivenza e gli endpoint funzionali della progenie fino al PND 90.
81. L'interpretazione dei risultati dello studio deve tener conto di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica, comprese le proprietà fisico-chimiche, tossicocinetiche e tossicodinamiche, delle informazioni pertinenti disponibili sugli analoghi strutturali e dei risultati degli studi di tossicità precedentemente svolti con la sostanza in esame (ad esempio sulla tossicità acuta, sulla tossicità dopo somministrazione ripetuta, gli studi meccanicistici e quelli per valutare se eventualmente sussistano notevoli differenze qualitative e quantitative delle proprietà metaboliche in vitro/in vivo da una specie all'altra). I risultati dell'autopsia macroscopica e della pesatura degli organi vanno valutati, quando possibile, in rapporto alle osservazioni fatte in altri studi a dose ripetuta. I rallentamenti nella crescita della progenie potrebbero essere imputati a un'influenza della sostanza in esame sulla composizione del latte e valutati in quest'ottica (29).

Coorte 2 (neurotossicità nella fase dello sviluppo)

82. I risultati delle valutazioni neurocomportamentali e neuropatologiche vanno interpretati nel contesto di tutti i reperti, utilizzando un metodo basato sulla forza probante dei dati, avvalorati dal parere di esperti. Si dovranno discutere gli eventuali tipi di effetti comportamentali o morfologici riscontrati, così come le prove della relazione dose-risposta. Questa caratterizzazione include la valutazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo, in particolare studi epidemiologici sull'uomo o rapporti di studi di casi e studi su animali sperimentali (ad esempio, dati tossicocinetiche, informazioni sulla relazione struttura-attività, i dati ottenuti da altri studi di tossicità). La valutazione dei dati include una discussione della significatività biologica e statistica e comprende l'eventuale relazione tra le alterazioni neuropatologiche e comportamentali osservate. Fare riferimento al metodo di prova B.53 (35) e a Tyl *et al.*, 2008 (31) per indicazioni sull'interpretazione dei risultati relativi alla neurotossicità nella fase dello sviluppo.

Coorte 3 (immunotossicità nella fase dello sviluppo)

83. La soppressione o la stimolazione della funzione immunitaria, valutate dalla prova di risposta anticorpale T-dipendente (TDAR), viene interpretata alla luce dell'insieme delle osservazioni effettuate. La rilevanza dell'esito di questa prova si potrà convalidare in presenza di altri effetti sugli indicatori associati ai fattori immunologici (ad esempio, cellularità del midollo osseo, peso e istopatologia dei tessuti linfoidi, distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie). È possibile che gli effetti evidenziati dalla prova di risposta anticorpale T-dipendente siano meno significativi quando si manifestano altri livelli di tossicità a un'esposizione a concentrazioni più basse.
84. Si consulti il documento d'orientamento dell'OCSE n. 43 (26) per indicazioni sull'interpretazione dei risultati in merito alla riproduzione e alla neurotossicità.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), "A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment", *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), "Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets", *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.
- (3) Zoetis, T. e I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls e T. Zoetis (2005), "Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group", *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), "Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment", *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), "Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey", *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann e B. Orthen (2003), "Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.
- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara e Y. Ohno (2000). "Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies", *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), "Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology", *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), "The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies", *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), "Cycles and Seasons", in C.R. Auston e R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi e R.I. Weiner (1977), "Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat", *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), "Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing", *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), "Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation", *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), "A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat", *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), "Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats", *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray e J.D. Suarez (1991), "The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulphonate Administration in the Rat". *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), "Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report", *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell e S. Schrader (1992), "Methods for Assessing Rat Sperm Motility", *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts e J.D. Suarez (1992), "Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration", *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), "Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations", *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.
 - (23) Slott, V.L., e S.D. Perreault (1993), "Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer", *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pagg. 319-333.
 - (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick e M.K. Smith (1989), "The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations", *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
 - (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott e J.D. Suarez (1992), "Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants", *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
 - (26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
 - (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), "Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility", *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
 - (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), "A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today", *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
 - (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, e R. Duffard (2006), "Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components", *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
 - (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), "Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats", *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
 - (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), "Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints", *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
 - (32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
 - (33) Capitolo B.43 del presente allegato, Studi di neurotossicità nei roditori
 - (34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
 - (35) Capitolo B.53 del presente allegato, Studio della neurotossicità nella fase dello sviluppo
 - (36) Capitolo B.54 del presente allegato, Saggio uterotropico sui roditori: prova di screening a breve termine delle proprietà estrogeniche
 - (37) Capitolo B.55 del presente allegato, Saggio di Hershberger sul ratto: saggio di screening a breve termine delle proprietà (anti)androgeniche
 - (38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
 - (39) OECD (2011), *Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada*, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
 - (40) OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.
-

Misure e osservazioni incluse nella serie di osservazioni funzionali (coorte 2A)

Stabulazione & campo aperto	Manipolazione	Fisiologia
Postura	Facilità di rimozione	Temperatura
Contrazioni muscolari involontarie toniche e cloniche	Facilità di manipolazione	Peso corporeo
Chiusura delle palpebre	Tono muscolare	Riflesso pupillare
Piloerezione	Risposta all'approccio	Ampiezza pupillare
Salivazione	Risposta al tatto	
Lacrimazione	Risposta auditiva	
Vocalizzazione	Risposta al pizzicamento della coda	
Impennata	Riflesso di raddrizzamento	
Andatura anormale	Divaricazione della zampa all'appoggio	
Eccitazione	Forza di prensione degli arti anteriori	
Stereotipia	Forza di prensione degli arti posteriori	
Comportamento insolito		
Macchie		
Respirazione anormale		

DEFINIZIONI

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

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