

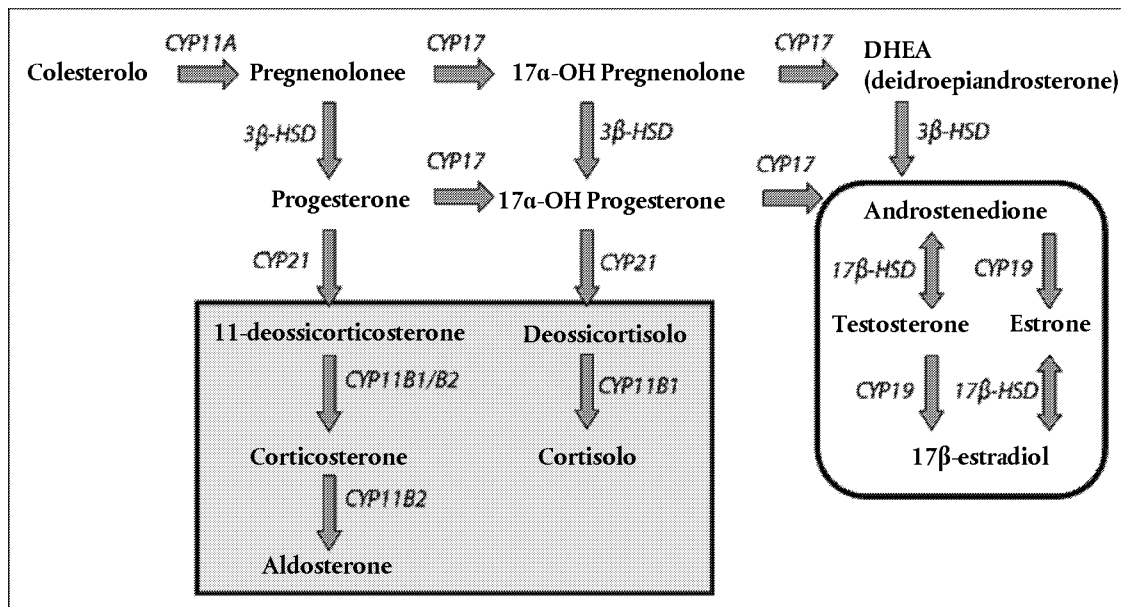
INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 456 (2011). Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario destinati a rivedere le linee guida esistenti e a elaborarne di nuove per lo screening e le prove delle sostanze ritenute potenzialmente interferenti endocrini (1). Il quadro concettuale dell'OCSE del 2002 riguardante la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino comprende cinque livelli, ciascuno corrispondente a un diverso grado di complessità biologica (1). Il saggio di steroidogenesi *in vitro* su H295R(H295R) descritto nel presente metodo di prova utilizza una linea cellulare umana allestita partendo da un carcinoma surrenalico (cellule NCI-H295R) e costituisce un "saggio in vitro che fornisce dati meccanicistici" di livello 2, da utilizzare a fini di screening e di prioritizzazione. Lo sviluppo e la normalizzazione del saggio in quanto mezzo per individuare gli effetti dei prodotti chimici sulla steroidogenesi, in particolare sulla produzione di 17-β-estradiolo (E2) e di testosterone (T), sono stati realizzati in varie fasi. Il saggio su H295R è stato ottimizzato e validato (2) (3) (4) (5).
2. L'obiettivo del saggio di steroidogenesi su H295R è individuare le sostanze chimiche che incidono sulla produzione di E2 e T. Il saggio su H295R intende identificare gli xenobiotici il cui sito o siti bersaglio sono le componenti endogene che costituiscono la via biochimica intracellulare che porta, attraverso una serie di reazioni, dal colesterolo alla produzione di E2 e/o T. Il saggio su H295R non è inteso a individuare le sostanze chimiche che condizionano la steroidogenesi a causa di effetti sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG). Il saggio si propone di fornire una risposta di tipo SI/NO riguardo al potenziale di una sostanza chimica di indurre o inibire la produzione di E2 e T; tuttavia, è possibile in alcuni casi ottenere risultati quantitativi (cfr. paragrafi 53 e 54). I risultati sono espressi come variazioni relative nella produzione di ormoni rispetto ai controlli con solvente (CS). Il saggio non mira a fornire informazioni meccanicistiche specifiche per quanto riguarda l'interazione tra la sostanza in esame e il sistema endocrino. Sono state effettuate ricerche utilizzando la linea cellulare per individuare gli effetti su enzimi e ormoni intermedi specifici, come il progesterone (2).
3. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nel presente metodo di prova sono descritte nell'appendice. Il protocollo dettagliato sulla preparazione delle soluzioni, la coltura delle cellule e lo svolgimento di vari aspetti della prova è disponibile nelle appendici I, II e III del documento dell'OCSE *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production* (4).

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. Nella biosintesi degli ormoni sessuali steroidei sono coinvolti cinque enzimi diversi che catalizzano sei reazioni diverse. La conversione enzimatica del colesterolo in pregnenolone attraverso l'enzima di scissione della catena laterale del colesterolo (CYP11A) legato al citocromo P450 (CYP) costituisce la tappa iniziale di una serie di reazioni biochimiche che sfociano nella sintesi degli ormoni sessuali steroidei finali. A seconda dell'ordine in cui avvengono le successive due reazioni, la steroidogenesi si suddivide in due processi, uno segue la via Δ⁵-idrossisteroide e l'altro la via Δ⁴-chetosteroide, che convergono nella produzione di androstenedione (figura 1).
5. L'androstenedione viene convertito in testosterone (T) dalla 17β-idrossisteroide deidrogenasi (17β-HSD). Il testosterone è contemporaneamente un ormone intermedio e un ormone finale. Nei maschi, il T può essere convertito in diidrotestosterone (DHT) attraverso la 5α-reduttasi, che si trova nelle membrane cellulari, nell'involucro nucleare e nel reticolo endoplasmatico dei tessuti bersaglio dell'attività androgenica, come prostata e vescicole seminali. Il DHT è considerevolmente più potente del T e viene considerato anche un ormone finale. Il saggio su H295R non misura il DHT (cfr. paragrafo 10).
6. L'enzima della via steroidogenica che converte le sostanze androgeniche in sostanze estrogeniche è l'aromatasi (CYP19). La CYP19 converte il T in 17β-estradiolo (E2) e l'androstenedione in estrone. L'E2 e il T sono considerati ormoni finali della via steroidogenica.
7. Per i substrati intermedi, la specificità dell'attività di liasi del CYP17 è diversa tra le specie. Nell'uomo, l'enzima favorisce i substrati della via Δ⁵-idrossisteroide (pregnenolone), mentre i substrati della via Δ⁴-chetosteroide (progesterone) sono favoriti nel ratto (19). Queste differenze nell'attività di liasi del CYP17 riescono forse a spiegare alcune differenze tra specie nella risposta alle sostanze chimiche che alterano la steroidogenesi in vivo (6). È stato dimostrato che le cellule H295 riflettono con maggiore fedeltà l'espressione dell'enzima surrenalico nell'uomo adulto e lo schema di produzione degli steroidi (20), ma si sa che esprimono gli enzimi delle vie Δ⁵-idrossisteroide e Δ⁴-chetosteroide per la sintesi degli androgeni (7) (11) (13) (15).

Via steroidogenica nelle cellule H295R



Nota:

Gli enzimi sono in corsivo, gli ormoni in grassetto, le frecce indicano la direzione della sintesi. Lo sfondo grigio indica le vie/i prodotti della categoria dei corticosteroidi. Le vie o i prodotti degli steroidi sessuali sono cerchiati. CYP = citocromo P450; HSD = idrossisteroide deidrogenasi; DHEA = deidroepiandrosterone.

8. La linea cellulare umana H295R, derivata da un carcinoma surrenalico, rappresenta un utile modello in vitro per l'indagine degli effetti sulla sintesi degli ormoni steroidei (2) (7) (8) (9) (10). La linea cellulare H295R esprime geni che codificano per tutti i principali enzimi per la steroidogenesi indicati sopra (11) (15) (figura 1). Si tratta di una caratteristica unica, in quanto l'espressione in vivo di questi geni dipende dallo stadio di sviluppo e dai tessuti; in genere, l'espressione di tutti i geni coinvolti nella steroidogenesi non avviene in un singolo tessuto o in un singolo stadio di sviluppo ma in diversi (2). Le cellule H295R hanno le caratteristiche fisiologiche delle cellule surrenaliche fetali umane zonalmente indifferenziate (11). Le cellule rappresentano un sistema in vitro unico, in quanto sono in grado di produrre tutti gli ormoni steroidei che si trovano nella corteccia surrenalica adulta e nelle gonadi che consentono di esaminare gli effetti sia sulla sintesi dei corticosteroidi sia sulla produzione degli ormoni sessuali steroidei quali gli androgeni e gli estrogeni, anche se il saggio è stato convalidato solo per rilevare T e E2. I cambiamenti registrati dal sistema sperimentale sotto forma di alterazioni nella produzione di T ed E2, possono essere il risultato di moltissime interazioni diverse tra le sostanze chimiche in esame e le funzioni steroidogeniche espresse dalle cellule H295R. Esse includono la modulazione dell'espressione, della sintesi o della funzione degli enzimi coinvolti nella produzione, trasformazione o eliminazione degli ormoni steroidei (12) (13) (14). L'inibizione della produzione di ormoni può essere dovuta a un legame competitivo diretto con un enzima nella via di sintesi, all'impatto su cofattori quali il NADPH (nicotinamideadeninucleotide fosfato) e il cAMP (adenosinmonofosfato ciclico) e/o a un'accelerazione del metabolismo degli steroidi o alla soppressione dell'espressione genica di taluni enzimi nella via steroidogenica. Mentre l'inibizione può dipendere dai processi, sia diretti sia indiretti, coinvolti nella produzione di ormoni, l'induzione agisce invece tipicamente in maniera indiretta, ad esempio incidendo su cofattori quali il NADPH e il cAMP (come nel caso della forskolina), rallentando il metabolismo degli steroidi (13) e/o regolando positivamente (*up-regulation*) l'espressione dei geni steroidogenici.

9. Il saggio su H295R presenta molti vantaggi:

- consente di rilevare sia aumento che diminuzione della produzione di T e E2;
- permette di verificare direttamente il potenziale impatto di una sostanza chimica sulla citotossicità/vitalità cellulare. Si tratta di una caratteristica importante, poiché consente di discriminare tra gli effetti dovuti alla citotossicità e quelli dovuti all'interazione diretta delle sostanze chimiche con le vie steroidogeniche, cosa che non è possibile fare nei sistemi a espianto tissutale costituiti da diversi tipi di cellule di sensibilità e funzionalità variabile;

- non comporta l'uso di animali;
 - la linea cellulare H295R è reperibile in commercio.
10. I limiti principali del saggio sono i seguenti:
- la sua capacità metabolica non è conosciuta, ma è probabilmente abbastanza limitata; di conseguenza il saggio non è in grado di rilevare le sostanze chimiche che devono essere attivate metabolicamente;
 - in quanto derivata da tessuti surrenalici, la H295R possiede enzimi in grado di produrre sia gli ormoni corticoidi minerali e glucocorticoidi sia quelli sessuali; pertanto, gli effetti sulla produzione di corticoidi minerali e glucocorticoidi possono influenzare i livelli di T e E2 osservati nel saggio;
 - il saggio non misura il DHT e non permette quindi di rilevare le sostanze che inibiscono la 5 α -reduttasi, per le quali si può utilizzare il saggio di Hershberger (16);
 - il saggio su H295R non individua le sostanze chimiche che interferiscono con la steroidogenesi incidendo sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG), interferenza che è possibile studiare solo su animali che presentano un asse HPG intatto.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

11. Scopo del saggio è l'individuazione delle sostanze chimiche che incidono sulla produzione di T e E2. Il T è anche un intermedio nella via di produzione di E2. Il saggio può individuare le sostanze chimiche che generalmente inibiscono o stimolano gli enzimi della via della steroidogenesi.
12. Il saggio è generalmente allestito in condizioni di coltura cellulare standard con piastre a 24 pozzetti; si possono utilizzare anche piastre di altre dimensioni; in questo caso, però, le condizioni di semina e quelle sperimentali vanno adeguate di conseguenza per mantenere la conformità con i criteri di prestazione.
13. Dopo un periodo di acclimatazione di 24 h in piastre multipozzetto, le cellule vengono esposte per 48 h a sette concentrazioni della sostanza in esame, almeno in triplicato. Vengono utilizzati, a una concentrazione fissa, come controlli negativi e positivi, il solvente, un inibitore e un induttore conosciuti della produzione di ormoni. Al termine del periodo di esposizione, il terreno è rimosso da ogni pozzetto. La vitalità cellulare in ciascun pozzetto è analizzata immediatamente dopo la rimozione del terreno. La concentrazione di ormoni nel terreno può essere misurata con diversi metodi, ad esempio i kit per la misura degli ormoni disponibili in commercio e/o le tecniche strumentali come la cromatografia in fase liquida/spettrometria di massa (LC-MS). I dati sono espressi sotto forma di LOEC e di fattore moltiplicativo (*fold change*) rispetto al controllo con solvente. Se il saggio è negativo, la più elevata concentrazione sperimentata viene registrata come NOEC. Le conclusioni circa la capacità di una sostanza chimica di influire sulla steroidogenesi devono basarsi su almeno due corse indipendenti del saggio. La prima può servire a definire il range delle concentrazioni, con un aggiustamento ulteriore delle concentrazioni nella seconda e terza corsa, se necessario, se si riscontrano problemi di solubilità o citotossicità o se l'attività della sostanza chimica sembra situarsi alla fine del range delle concentrazioni testate.

PROTOCOLLO DI COLTURA

Linea cellulare

14. Le cellule NCI-H295R sono disponibili in commercio presso l'*American Type Culture Collections* (ATCC) previa sottoscrizione di un accordo sul trasferimento di materiale (*Material Transfer Agreement, MTA*) ⁽¹⁾.

Introduzione

15. Dato che la capacità di produzione di E2 delle cellule varia in rapporto all'età/ai passaggi in coltura (2), occorre coltivare le cellule secondo un protocollo specifico prima di poterle utilizzare; è necessario registrare il numero dei passaggi dal momento dello scongelamento delle cellule, nonché il numero del passaggio nel quale avviene il congelamento e la conservazione delle cellule in azoto liquido. Il primo numero indicherà l'effettivo numero di passaggi ai quali le cellule sono state sottoposte mentre il secondo identifica il numero del passaggio nel quale le cellule sono state congelate e conservate. Ad esempio, le cellule che sono state congelate dopo il passaggio numero 5, per essere poi scongelate e separate tre volte (4 passaggi, contando le cellule appena scongelate come "passaggio 1"), dopo la nuova coltivazione saranno etichettate con il numero di passaggio 4.5. Un esempio di sistema di numerazione è contenuto nell'appendice I della relazione di validazione (4).
16. La soluzione madre viene utilizzata come base per il terreno supplementato e per il terreno di congelamento. Il terreno supplementato è un componente necessario per la coltura delle cellule. Il terreno di congelamento è specificamente formulato per consentire il congelamento senza impatto sulle cellule, per una conservazione prolungata.

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

Prima dell'uso, il Nu-serum [o un siero equiparabile a parità di proprietà e di cui è comprovata la capacità di produrre dati che soddisfano i requisiti per l'esecuzione del saggio e per il controllo della qualità (CQ)], che è un componente del terreno supplementato, va analizzato per ricercarvi le concentrazioni di fondo di T e E2. La preparazione delle soluzioni citate è descritta nell'appendice II della relazione di validazione (4).

17. Dopo l'iniziazione di una coltura cellulare H295R da un lotto originale di cellule ATCC, occorre coltivare le cellule per cinque passaggi (vale a dire, le cellule vengono separate quattro volte). Le cellule del passaggio 5 vengono poi congelate in azoto liquido, per conservarle. Prima di congelare le cellule occorre testarne un campione del precedente passaggio 4 su una piastra CQ (cfr. paragrafi 36 e 37) per verificare se la produzione basale di ormoni e la risposta alle sostanze di controllo positive soddisfano i criteri CQ del saggio, indicati nella tabella 5.
18. Le cellule H295R devono essere coltivate, congelate e conservate in azoto liquido, per garantire di avere sempre a disposizione cellule da coltivare e utilizzare appartenenti al passaggio o all'età idonei. Dopo la messa in coltura di un lotto di cellule nuovo ⁽¹⁾ o congelato ⁽²⁾, il numero massimo di passaggi accettabile per il saggio su H295R non deve superare i 10. Ad esempio, per le colture di cellule a partire da un lotto congelato al passaggio 5, si andrà da 4.5 a 10.5. Per la preparazione delle cellule a partire dai lotti congelati, si applica il protocollo descritto al paragrafo 19. Queste cellule vengono coltivate per almeno quattro (4) passaggi supplementari (passaggio 4.5) prima di essere utilizzate nelle prove.

Preparazione delle cellule da soluzione congelata

19. Il protocollo per la preparazione delle cellule a partire da una soluzione congelata va utilizzato quando un nuovo lotto di cellule viene rimosso dall'azoto liquido, dove era conservato, al fine di coltivarlo e analizzarlo. I dettagli di questo protocollo sono illustrati nell'appendice III della relazione di validazione (4). Le cellule sono rimosse dall'azoto liquido dove erano conservate, scongelate rapidamente, collocate in un terreno supplementato in una provetta da centrifuga, centrifugate a temperatura ambiente, risospese in terreno supplementato e trasferite in una fiasca di coltura. Il terreno va cambiato il giorno successivo. Le cellule H295R sono coltivate in incubatore a 37 °C in atmosfera al 5 % di CO₂ e il terreno va rinnovato 2-3 volte alla settimana. Quando le cellule hanno raggiunto una confluenza di circa l'85-90 %, vanno divise. La divisione è necessaria per garantire la salute e la crescita delle cellule e preservarle per eseguire ulteriori saggi. Le cellule vengono risciacquate tre volte con soluzione salina tampone fosfato (PBS, senza Ca²⁺ Mg²⁺) e staccate dalla fiasca di coltura tramite aggiunta di un enzima appropriato, ad esempio tripsina, nel PBS (senza Ca²⁺ Mg²⁺). Subito dopo il distacco delle cellule dalla fiasca di coltura, si interrompe l'azione enzimatica aggiungendo un volume di terreno supplementato tre volte superiore al volume del trattamento enzimatico utilizzato. Mettere le cellule in una provetta da centrifuga, centrifugarle a temperatura ambiente, rimuovere il surnatante e risospendere il pellet di cellule in terreno supplementato. Collocare una quantità adeguata di soluzione di cellule nella nuova fiasca di coltura. La quantità di soluzione di cellule va regolata in modo che le cellule siano confluenti entro 5-7 giorni. Il rapporto raccomandato per la subcoltura va da 1:3 a 1:4. Occorre poi etichettare accuratamente la piastra. Le cellule sono ora pronte per essere utilizzate per il saggio; quelle in eccesso vanno congelate in azoto liquido come descritto nel paragrafo 20.

Congelamento di cellule H295R (preparazione delle cellule per la conservazione in azoto liquido)

20. Per preparare le cellule H295R per il congelamento occorre seguire il protocollo descritto sopra per la divisione delle cellule, fino alla fase di risospensione del pellet di cellule presenti sul fondo della provetta da centrifuga. Il pellet viene allora risospeso in terreno di congelamento. La soluzione viene trasferita in una provetta criogenica, etichettata adeguatamente, è congelata a - 80 °C per 24 ore e successivamente trasferita in azoto liquido per conservarla. I dettagli di questo protocollo sono illustrati nell'appendice III della relazione di validazione (4).

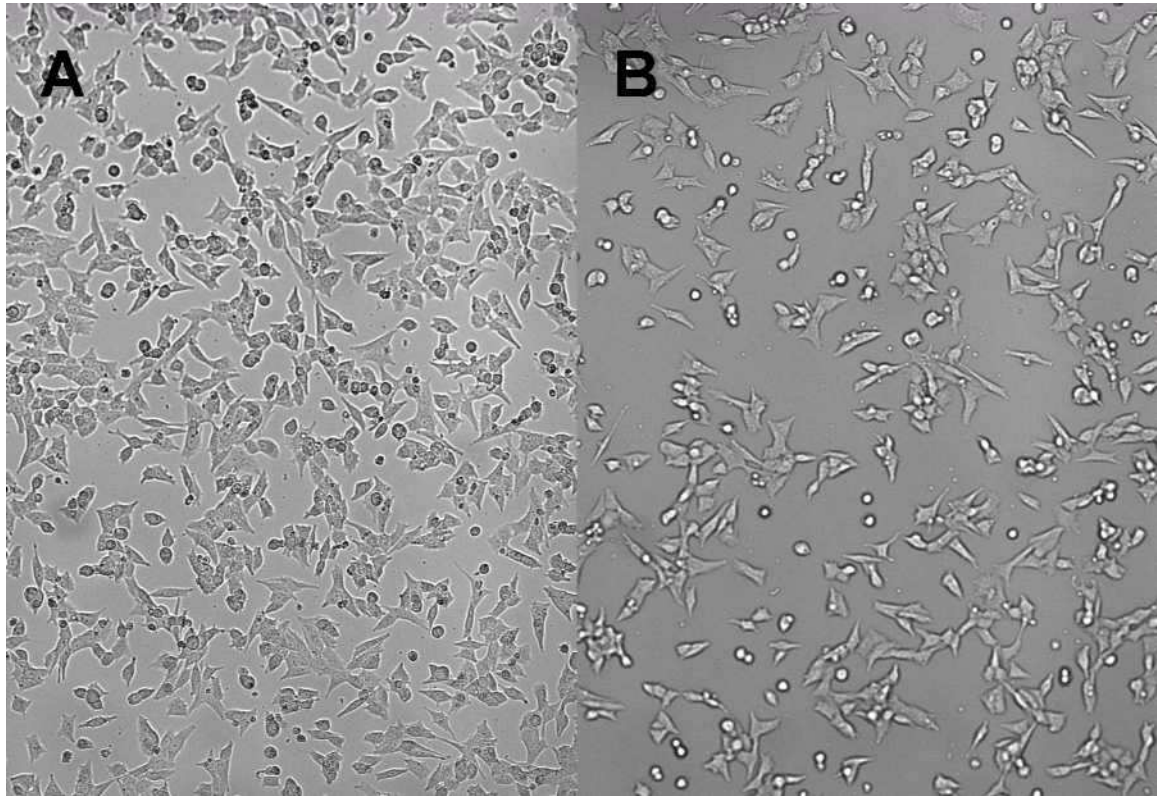
Piastratura e preincubazione di cellule per le prove

21. Il numero di piastre a 24 pozzetti, preparate come indicato al paragrafo 19, dipende dal numero di sostanze chimiche da sottoporre a prova e dalla confluenza delle cellule nelle piastre di coltura. In generale, una fiasca di coltura (75 cm²) con cellule confluenti all'80-90 % fornirà cellule sufficienti per 1 o 1,5 piastre (a 24 pozzetti) con una densità ottimale compresa tra 200 000 e 300 000 cellule per ml di terreno, risultante in una confluenza del 50-60 % nei pozzetti a 24 ore (figura 2). Questa è la densità ottimale per la produzione di ormoni nel saggio. A densità superiori, i modelli di produzione di T e di E2 risultano alterati. Prima di eseguire il saggio per la prima volta, si raccomanda di saggiare diverse densità tra 200 000 e 300 000 per ml e di scegliere, per le prove sperimentali successive, la densità che produce una confluenza del 50-60 % nei pozzetti a 24 ore.

⁽¹⁾ "Nuovo lotto" si riferisce a un nuovo lotto di cellule proveniente da ATCC.

⁽²⁾ "Lotto congelato" si riferisce a cellule precedentemente coltivate e quindi congelate presso un laboratorio diverso da ATCC.

Fotomicrografia di cellule H295R a densità di semina del 50 % in una piastra a 24 pozzetti a 24 ore, presa al bordo (A) e al centro (B) di un pozzetto



22. Il terreno è pipettato dalla fiasca di coltura e le cellule vengono risciacquate 3 volte con PBS sterile (senza Ca^{2+} e Mg^{2+}). Aggiungere una soluzione enzimatica (nella PBS) per staccare le cellule dalla fiasca di coltura. Dopo aver dato tempo alle cellule di staccarsi, interrompere l'azione dell'enzima aggiungendo un volume di terreno supplementato tre volte superiore al volume della soluzione enzimatica utilizzata. Mettere le cellule in una provetta da centrifuga, centrifugarle a temperatura ambiente, rimuovere il surnatante e risospendere il pellet di cellule in terreno supplementato. Calcolare la densità delle cellule utilizzando, ad esempio, un emocitometro o un contacellule. Diluire la soluzione cellulare fino a raggiungere la densità desiderata per la placcatura e miscelare accuratamente per garantire una densità omogenea delle cellule. Piastrare le cellule utilizzando 1 ml di soluzione di cellule/pozzetto ed etichettare accuratamente le piastre e i pozzetti. Incubare le piastre seminate a 37 °C per 24 ore in atmosfera al 5 % di CO_2 , per consentire alle cellule di aderire ai pozzetti.

REQUISITI PER IL CONTROLLO DI QUALITÀ (CQ)

23. È fondamentale immettere nei pozzetti il volume esatto di soluzioni e campioni durante il dosaggio, perché questi volumi determinano le concentrazioni utilizzate nel calcolo dei risultati del saggio.
24. Prima di avviare la coltura cellulare e di svolgere qualunque prova, ciascun laboratorio deve dimostrare la sensibilità del suo sistema di misura degli ormoni (paragrafi 29-31).
25. Se si prevede di svolgere prove di misura degli ormoni utilizzando anticorpi, prima di procedere agli esperimenti è necessario analizzare le sostanze in esame per verificarne il potenziale di interferenza con il sistema di misura utilizzato per quantificare T e E2, come indicato al paragrafo 32.

26. Il solvente raccomandato per il saggio è il DMSO. Se si utilizza un altro solvente è necessario determinare quanto segue:

- la solubilità della sostanza chimica di prova, della forscolina e del procloraz nel solvente; e
- la citotossicità in funzione della concentrazione del solvente.

Si raccomanda che la concentrazione massima consentita del solvente non superi una diluzione pari a 10× la sua concentrazione citotossica più bassa.

27. Prima di effettuare gli esperimenti per la prima volta, il laboratorio deve condurre una prova di idoneità per dimostrare che è in grado di mantenere e ottenere le colture cellulari nelle condizioni sperimentali adeguate allo svolgimento delle prove sulle sostanze chimiche descritte nei paragrafi da 33 a 35.
28. Prima di utilizzarle per un esperimento, occorre eseguire una prova su una piastra di controllo con ogni nuovo lotto di cellule per valutarne il rendimento, come descritto ai paragrafi 36 e 37.

Prestazioni del sistema di misura degli ormoni

Sensibilità, accuratezza, precisione e reattività incrociata con la matrice del campione

29. Ogni laboratorio può scegliere il sistema di misura degli ormoni da utilizzare per l'analisi della produzione di T e E2 da cellule H295R, a condizione che soddisfi i criteri di prestazione, incluso il limite di quantizzazione (LOQ). In principio, il limite è di 100 pg/ml per il T e di 10 pg/ml per l'E2, sulla base dei livelli basali degli ormoni osservati negli studi di validazione. Tuttavia, possono essere necessari livelli più alti o più bassi in funzione dei livelli basali raggiunti nel laboratorio che esegue la prova. Prima di saggiare le piastre CQ e svolgere corse sperimentali, il laboratorio deve dimostrare, mediante l'analisi del terreno supplementato addizionato con un ormone interno di controllo, che il saggio sugli ormoni che prevede di utilizzare sia in grado di misurare le concentrazioni di ormoni nel terreno supplementato con sufficiente accuratezza e precisione da soddisfare i criteri CQ indicati nelle tabelle 1 e 5. Il terreno supplementato va addizionato con almeno tre concentrazioni di ciascun ormone e in seguito va analizzato (esempi di concentrazione: 100, 500 e 2 500 pg/ml di T; 10, 50 e 250 pg/ml di E2; oppure si possono usare le concentrazioni più basse possibili sulla base del limite di rivelazione per il sistema di misura per l'ormone scelto per i picchi di concentrazione per T e E2). Le concentrazioni ormonali misurate dei campioni non estratti non devono scostarsi di più del 30 % dalle concentrazioni nominali, e le variazioni tra le misure replicate sullo stesso campione non devono superare il 25 % (cfr. anche tabella 8, per ulteriori criteri CQ). Se questi criteri CQ sono soddisfatti, si suppone che il saggio di misura degli ormoni prescelti sia sufficientemente accurato, preciso e privo di reazioni incrociate con componenti del terreno (matrice del campione) tali da far prevedere un impatto significativo sui risultati dell'analisi. In tal caso, non è richiesta l'estrazione di campioni prima della misura degli ormoni.
30. Nel caso in cui i criteri CQ riportati nelle tabelle 1 e 8 non siano soddisfatti potrebbe verificarsi un significativo effetto matrice, nel qual caso occorre svolgere un esperimento procedendo a un'estrazione sul terreno addizionato. Un esempio di procedura di estrazione è contenuto nell'appendice II della relazione di validazione (4). Le misure delle concentrazioni di ormoni presenti nei campioni estratti vanno svolte in triplicato (¹). Se è possibile dimostrare che dopo l'estrazione, conformemente ai criteri CQ, i componenti del terreno di coltura non interferiscono con il metodo di rilevazione degli ormoni, tutti gli ulteriori esperimenti saranno svolti utilizzando campioni estratti. Se i criteri CQ non sono soddisfatti dopo l'estrazione, ciò significa che il sistema di misura degli ormoni utilizzato non è adeguato ai fini del saggio di steroidogenesi su H295R e che sarà necessario utilizzarne uno diverso.

Curva standard

31. Le concentrazioni di ormoni dei controlli con solvente (CS) devono situarsi nella parte lineare della curva standard. È preferibile che i valori CS risultino in prossimità del centro della parte lineare, per garantire che sia possibile misurare l'inibizione o l'induzione della sintesi degli ormoni. Le diluizioni del terreno (o degli estratti) da misurare vanno selezionate di conseguenza. La relazione lineare viene determinata mediante un metodo statistico adeguato.

Prova sull'interferenza delle sostanze chimiche

32. Se per misurare gli ormoni si prevede di svolgere saggi a base di anticorpi, come i test immunoenzimatici (ELISA) o radioimmunologici (RIA), è necessario verificare la potenziale interferenza di ogni sostanza chimica con il sistema di misura degli ormoni che sarà utilizzato, prima ancora di avviare i saggi sulle sostanze chimiche stesse [appendice III della relazione di validazione (4)], perché alcune di queste possono interferire con i suddetti test (17). Se si verifica un'interferenza ≥ 20 % della produzione basale di ormoni per il T o l'E2, determinata dall'analisi degli ormoni, è necessario svolgere il "Test di interferenza delle sostanze chimiche con la misura degli ormoni" [descritto nell'appendice III, sezione 5.0, della relazione di validazione (4)] su tutte le diluizioni della soluzione

(¹) Nota : Se è richiesta l'estrazione, su ogni estratto vanno condotte tre misure replicate. Ogni campione viene estratto una sola volta.

madre delle sostanze in esame per determinare la dose soglia a partire dalla quale si verifica un'interferenza di rilievo (cioè $\geq 20\%$). Se l'interferenza è inferiore al 30% i risultati possono essere corretti di conseguenza. Se l'interferenza è superiore al 30% i dati non sono da considerarsi validi e, relativamente a queste concentrazioni, sono scartati. Se si verifica un'interferenza significativa di una sostanza chimica in esame con il sistema di misura degli ormoni a diverse concentrazioni non citotossiche, è necessario utilizzare un sistema di misura diverso. Al fine di evitare interferenze causate da sostanze chimiche contaminanti si raccomanda di estrarre dal terreno gli ormoni utilizzando un solvente apposito; dei metodi a questo fine sono illustrati nella relazione di validazione (4).

Tabella 1

Criteria di prestazione dei sistemi per la misura degli ormoni

Parametro	Criterio
Sensibilità del metodo di misura	Limite di quantizzazione (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Efficienza nell'estrazione degli ormoni (solo nel caso in cui l'estrazione sia necessaria)	I tassi medi di recupero (sulla base delle misure in triplicato) delle quantità di ormoni addizionati non mostrano uno scarto superiore al 30% rispetto alla quantità addizionata.
Interferenza della sostanza chimica (solo per i sistemi a base di anticorpi)	Non deve verificarsi una reattività incrociata significativa ($\geq 30\%$ della produzione basale di ormoni, per l'ormone considerato) con nessuno degli ormoni prodotti dalle cellule ^(b) ^(c) .

^(a) Nota: i limiti del metodo di misura si fondano sulla produzione basale di ormoni, illustrata alla tabella 5, e si basano sulle prestazioni. Se la produzione basale di ormoni aumenta, anche il limite può aumentare.

^(b) A percentuali più elevate alcuni anticorpi del T e dell'E2 possono produrre una reazione incrociata con, rispettivamente, l'androstenedione e l'estrone. In questi casi non è possibile determinare con esattezza gli effetti sulla 17 β -HSD. Tuttavia, i dati possono ancora fornire informazioni utili a proposito degli effetti sulla produzione di estrogeni o di androgeni in generale. In questi casi, i dati dovrebbero essere espressi come risposta androgenica/estrogenica anziché relativa al T e all'E2.

^(c) Vale a dire: colesterolo, pregnenolone, progesterone, 11-desossicorticosterone, corticosterone, aldosterone, 17 α -pregnenolone, 17 α -progesterone, deossicortisol, cortisol, DHEA (deidroepiandrosterone), androstenedione, estrone.

Test d'idoneità del laboratorio

33. Prima di svolgere prove su sostanze chimiche sconosciute, un laboratorio deve svolgere un test d'idoneità per dimostrare di essere in grado di ottenere e mantenere adeguate colture cellulari e condizioni sperimentali, quali quelle richieste per il corretto svolgimento del saggio. Dato che la riuscita di un saggio è strettamente dipendente dal personale di laboratorio che lo esegue, i protocolli del test di idoneità vanno in parte ripetuti in caso di cambiamento di personale.
34. Il test di idoneità sarà svolto nelle stesse condizioni sperimentali descritte ai paragrafi da 38 a 40, esponendo le cellule a 7 concentrazioni in scala crescente di induttori e inibitori — forti, medi e lievi — e a una sostanza chimica negativa (cfr. tabella 2). Più precisamente, come indicato dalla tabella 2, le sostanze chimiche da sottoporre a prova sono: la forskolina (n. CAS 66575-29-9), induttore forte; il procloraz (n. CAS 67747-09-5), inibitore forte; l'atrazina (n. CAS 1912-24-9), induttore moderato; l'aminoglutetimide (n. CAS 125-84-8), inibitore moderato; il bisfenolo A (n. CAS 80-05-7) induttore lieve (produzione di E2) e inibitore lieve (produzione di T); e la gonadotropina corionica umana (HCG) (n. CAS 9002-61-3), sostanza negativa. Vanno testate piastre separate per tutte le sostanze chimiche, secondo il formato illustrato nella tabella 6. Nei test d'idoneità, per ciascuna corsa quotidiana delle prove sulle sostanze chimiche va inclusa una piastra per il controllo CQ (tabella 4, paragrafi 36 e 37)

Tabella 2

Sostanze chimiche per il test d'idoneità e concentrazioni di esposizione

Sostanza chimica	Concentrazioni di prova [μ M]
Procloraz	0 ^(a) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolina	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Sostanza chimica	Concentrazioni di prova [μM]
Atrazina	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimide	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenolo A	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

^(a) Controllo con solvente (DMSO) (0), 1 μl DMSO/pozzetto

Durante il test d'idoneità, l'esposizione delle H295R alle sostanze chimiche avviene in piastre a 24 pozzetti. Il dosaggio è in μM per tutte le dosi della sostanza chimica in esame. Le dosi vanno somministrate nel DMSO a 0,1 % (v/v) per pozzetto. Tutte le concentrazioni di prova devono essere testate nei pozzetti in triplicato (tabella 6). Per ciascuna sostanza chimica si utilizza una piastra distinta. Viene inclusa una piastra di CQ per ogni corsa giornaliera.

35. Occorre svolgere l'analisi di vitalità cellulare e l'analisi ormonale, come indicato nei paragrafi da 42 a 46. Vanno registrati il valore di soglia (LOEC) e le categorie di decisione, confrontandoli con i valori riportati in tabella 3. I dati sono considerati accettabili se conformi alla LOEC e alla decisione di classificazione di cui alla tabella 3.

Tabella 3

LOEC e categorie di decisioni sulla classificazione per le sostanze chimiche del test di idoneità

	N. CAS	LOEC [μM]		Categoria di decisione	
		T	E2	T	E2
Procloraz	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ ^(a) (inibizione)	+ (inibizione)
Forscolina	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (induzione)	+ (induzione)
Atrazina	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (induzione)	+ (induzione)
Aminoglutetimide	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inibizione)	+ (inibizione)
Bisfenolo A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inibizione)	+ (induzione)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	negativo	negativo

^(a) +, positivo

n/a: non applicabile, in quanto non devono verificarsi modifiche dopo l'esposizione a concentrazioni non citotossiche del controllo negativo.

Piastra per il controllo della qualità (CQ)

36. La piastra CQ viene utilizzata per verificare il rendimento delle cellule H295R in condizioni di coltura standard e per stabilire una serie di dati storici per le concentrazioni di ormoni nei controlli con solvente, nei controlli positivi e negativi, e in altre misure di CQ nel corso del tempo.
- Il rendimento delle cellule H295R va valutato ricorrendo a una piastra CQ per ogni nuovo lotto ATCC o dopo aver utilizzato un lotto di cellule precedentemente congelate per la prima volta, salvo quando il test di idoneità (paragrafi da 32 a 34) è stato svolto utilizzando lo stesso lotto di cellule.
 - Quando le sostanze chimiche sono sottoposte a prova, la piastra CQ fornisce una valutazione completa delle condizioni sperimentali (vitalità cellulare, controlli con solvente, controlli negativi e positivi, nonché variabilità intra- e inter-prova), e deve essere parte integrante di ciascuna corsa.
37. La prova CQ va svolta su una piastra a 24 pozzetti secondo gli stessi protocolli di incubazione, dosaggio, vitalità/tossicità cellulare, estrazione e analisi degli ormoni, descritti nei paragrafi da 38 a 46 per le prove sulle sostanze chimiche. La piastra CQ contiene: bianchi, controlli con solvente e due concentrazioni di un induttore noto

(forscolina, 1, 10 μM) e di un inibitore noto (procloraz, 0,1, 1 μM) della sintesi di E2 e T. Inoltre, in alcuni pozzetti si utilizza il MeOH come controllo positivo per la prova di vitalità/citotossicità. Una descrizione dettagliata della configurazione della piastra è fornita nella tabella 4. I criteri da soddisfare riguardo alla piastra CQ sono elencati in tabella 5. Occorre raggiungere la quantità minima di produzione basale di ormoni per il T e l'E2 sia nei pozzetti del controllo con solvente che in quelli del bianco.

Tabella 4

Configurazione della piastra di controllo per testare il rendimento delle cellule H295R non esposte e delle cellule esposte a inibitori conosciuti (PRO = procloraz) e induttori conosciuti (FOR = forscolina) della produzione di E2 e T. Al termine dell'esposizione e dopo aver rimosso il terreno, aggiungere un soluzione al 70 % di metanolo a tutti i pozzetti con MeOH, che serviranno da controllo positivo per la citotossicità [cfr. la prova di citotossicità nell'appendice III della relazione di validazione (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	bianco ^(a)	bianco ^(a)	bianco ^(a)	bianco ^(a) (+ MeOH) ^(b)	bianco ^(a) (+ MeOH) ^(b)	bianco ^(a) (+ MeOH) ^(b)
B	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

^(a) Le cellule nei pozzetti del bianco ricevono solo terreno (senza solvente).

^(b) Il metanolo (MeOH) viene aggiunto **dopo** che l'esposizione ha avuto termine e il terreno è stato rimosso da questi pozzetti.

^(c) Controllo con solvente DMSO (1 μl /pozzetto).

Tabella 5

Criteri di rendimento per la piastra CQ

	T	E2
Produzione basale di ormoni nel controllo con solvente (CS)	≥ 5 volte il LOQ	$\geq 2,5$ volte il LOQ
Induzione (10 μM forscolina)	$\geq 1,5$ volte il CS	$\geq 7,5$ volte il CS
Inibizione (1 μM procloraz)	$\leq 0,5$ volte il CS	$\leq 0,5$ volte il CS

PROTOCOLLO DELL'ESPOSIZIONE ALLE SOSTANZE CHIMICHE

38. Rimuovere dall'incubatore le cellule preincubate (paragrafo 21) e verificarle al microscopio per assicurarsi che siano in buono stato (adesione, morfologia) prima della somministrazione delle dosi.
39. Collocare le cellule in una cappa di sicurezza biologica e rimuovere il terreno supplementato sostituendolo con terreno supplementato nuovo (1 ml/pozzetto). Il solvente preferito per questo metodo di prova è il DMSO. Se tuttavia sussistono ragioni per utilizzare altri solventi, la scelta va accompagnata da motivazioni scientifiche. Esporre le cellule alla sostanza chimica in esame aggiungendo 1 μl della soluzione madre adeguata nel DMSO [cfr. appendice II della relazione di convalida (4)] per 1 ml di terreno supplementato (volume del pozzetto). Nei

pozzetti risulterà una concentrazione finale dello 0,1 % del DMSO. Per assicurare una congrua miscelazione è generalmente preferibile che la soluzione madre adeguata della sostanza chimica in esame nel DMSO venga mescolata con terreno supplementato così da ottenere la concentrazione finale desiderata per ciascuna dose, e che la miscela venga aggiunta a ciascun pozzetto immediatamente dopo la rimozione del vecchio terreno. Se viene scelta questa modalità, occorre che la concentrazione di DMSO (0,1 %) rimanga costante in tutti i pozzetti. Utilizzando uno stereomicroscopio, esaminare visivamente i pozzetti contenenti le due concentrazioni più alte per rilevare eventuali formazioni di precipitati oppure opacità che indicherebbero una solubilità incompleta della sostanza in esame. In presenza di queste condizioni (opacità, formazione di precipitati) occorre esaminare anche i pozzetti contenenti la concentrazione immediatamente inferiore (e così via) ed escludere da ogni successiva valutazione ed analisi le concentrazioni non completamente disciolte. Rimettere la piastra nell'incubatore a 37 °C per 48 ore in atmosfera al 5 % di CO₂. La configurazione della piastra è descritta nella tabella 6. I campi da "soluzione 1" a "soluzione 7" si riferiscono ai dosaggi scalari crescenti della sostanza in esame.

Tabella 6

Disposizione delle dosi per l'esposizione delle cellule H295R alle sostanze chimiche in esame, in una piastra a 24 pozzetti.

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Soluzione 4	Soluzione 4	Soluzione 4
B	Soluzione 1	Soluzione 1	Soluzione 1	Soluzione 5	Soluzione 5	Soluzione 5
C	Soluzione 2	Soluzione 2	Soluzione 2	Soluzione 6	Soluzione 6	Soluzione 6
D	Soluzione 3	Soluzione 3	Soluzione 3	Soluzione 7	Soluzione 7	Soluzione 7

40. Dopo 48 ore rimuovere la piastra di esposizione dall'incubatore e controllare ogni pozzetto al microscopio verificando le condizioni della cellula (adesione, morfologia, grado di confluenza) e segni di citotossicità. Suddividere il terreno di ogni pozzetto in due parti uguali (circa 490 µl ciascuna) e trasferirle in due fiale adeguatamente etichettate (vale a dire, un'aliquota come campione di riserva per ciascun pozzetto). Per evitare il disseccamento delle cellule, rimuovere il terreno una colonna o una riga per volta, sostituendolo con il terreno per la prova di vitalità cellulare/citotossicità. Se la vitalità/citotossicità non va misurata immediatamente, aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di PBS con Ca²⁺ e Mg²⁺. Congelare il terreno a -80 °C finché sarà necessario procedere a ulteriori analisi delle concentrazioni ormonali (cfr. paragrafi da 44 a 46). Il T e l'E2 sono in genere stabili per almeno tre mesi in un terreno conservato a -80 °C, ma è opportuno che la stabilità degli ormoni durante la conservazione sia documentata in ciascun laboratorio.
41. Immediatamente dopo la rimozione del terreno, determinare la vitalità cellulare/citotossicità per ciascuna piastra di esposizione.

Determinazione della vitalità cellulare

42. Per determinare l'impatto potenziale della sostanza chimica sulla vitalità cellulare è possibile utilizzare qualsiasi saggio di vitalità/citotossicità, che deve essere in grado di fornire la misura reale della percentuale di cellule vitali presenti in un pozzetto; oppure è necessario dimostrare che tale dato è direttamente comparabile con (una funzione lineare de) la prova condotta con un kit Live/Dead® [cfr. appendice III della relazione di validazione (4)]. Un'altra prova che ha dimostrato di funzionare altrettanto bene è il test MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro] (18). La valutazione della vitalità cellulare svolta con i metodi appena citati costituisce una valutazione relativa che non presenta necessariamente una relazione lineare con il numero assoluto di cellule in un pozzetto. Pertanto, l'analista svolge una valutazione visiva soggettiva in parallelo di ciascun pozzetto e scatta foto digitali dei controlli con solvente e delle due maggiori concentrazioni non citotossiche, che verranno archiviate per consentire eventualmente una valutazione successiva della vera densità cellulare, se necessario. Se il controllo visivo o la prova di vitalità/citotossicità suggeriscono un probabile incremento del numero di cellule, questo apparente incremento va verificato. Se l'incremento viene comprovato, è necessario indicarlo nella relazione sulla prova. La vitalità delle cellule viene espressa in rapporto alla risposta media nei controlli con solvente, nei quali si considera che sia pari al 100 %, ed è calcolata nella maniera più consona al tipo di prova di vitalità/citotossicità utilizzato. Per il test MTT, si può utilizzare la seguente formula:

% di vitalità cellulare = [risposta nel pozzetto – risposta media nei pozzetti trattati con MeOH (= 100 % di cellule morte)] – [risposta media nei pozzetti CS – risposta media nei pozzetti trattati con MeOH (= 100 % di cellule morte)]

43. I pozzetti con una vitalità inferiore all'80 % rispetto alla vitalità media nei pozzetti CS (= 100 % di cellule vive), non vanno inclusi nell'analisi finale dei dati. L'inibizione della steroidogenesi che si verifica in presenza di circa il 20 % di citotossicità necessita di essere attentamente esaminata per assicurarsi che la citotossicità non ne sia la causa.

Analisi ormonale

44. Per l'analisi del T e dell'E2, ciascun laboratorio può utilizzare un sistema per la misura degli ormoni di sua scelta. Le aliquote di riserva del terreno di ciascun gruppo di trattamento possono essere utilizzate per preparare diluizioni che portino la concentrazione all'interno della parte lineare della curva standard. Come segnalato al paragrafo 29, ciascun laboratorio deve dimostrare la conformità del suo sistema di misura degli ormoni con i criteri di CQ (utilizzando, ad esempio: ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS), analizzando il terreno supplementato addizionato con gli ormoni di controllo interno. Per assicurarsi che i componenti del sistema sperimentale non interferiscano con la misura degli ormoni, potrebbe essere necessario estrarre gli ormoni dai terreni prima di misurarli (cfr. paragrafo 30 per le condizioni nelle quali un'estrazione è o non è richiesta). Si raccomanda di procedere all'estrazione secondo i protocolli di cui all'appendice III della relazione di validazione (4).
45. Se viene utilizzato un kit reperibile in commercio per misurare la produzione di ormoni, l'analisi ormonale va svolta come specificato nel manuale fornito dal fabbricante del kit. La maggior parte dei fabbricanti indica un'unica procedura per svolgere le analisi ormonali. Le diluizioni dei campioni vanno adeguate in modo che le concentrazioni ormonali per i controlli con solvente si situino al centro dell'intervallo di linearità della curva standard della prova interessata [appendice III della relazione di validazione (4)]. I valori al di fuori dell'intervallo di linearità della curva standard devono essere scartati.
46. Le concentrazioni ormonali finali sono calcolate come segue:

Esempio:

Estratto:	450 µl di terreno
Ricostituito in:	250 µl di tampone
Tenore di diluizione nella prova:	1:10 (per portare il campione nell'intervallo di linearità della curva standard)
Concentrazione ormonale nel saggio:	150 pg/ml (già adeguata alla concentrazione/ml del campione saggiato)
Recupero:	89 %
Concentrazione ormonale finale =	(concentrazione degli ormoni (per ml) ÷ recupero) (fattore di diluizione)
Concentrazione ormonale finale =	$(150 \text{ pg/ml}) \div (0,89) \times (250 \text{ µl}/450 \text{ µl}) \times 10 = 936,3 \text{ pg/ml}$

Selezione delle concentrazioni sperimentali

47. Occorre svolgere come minimo due corse indipendenti della prova. Salvo in presenza di precedenti informazioni che forniscono una base a partire dalla quale scegliere le concentrazioni sperimentali (ad esempio informazioni sui limiti di solubilità o sulla citotossicità), per la corsa iniziale si raccomanda di spaziare le concentrazioni ad intervalli \log_{10} con concentrazione massima di 10^{-3} M. Se la sostanza chimica è solubile e non citotossica a

nessuna delle concentrazioni impiegate, e se la prima corsa è risultata negativa per tutte le concentrazioni, occorre confermare i risultati attraverso una seconda corsa svolta utilizzando le stesse modalità della prima (tabella 7). Se i risultati della prima corsa sono *ambigui* (vale a dire se il fattore moltiplicativo del cambiamento rispetto al controllo con solvente è statisticamente significativo solo per un'unica concentrazione) o *positivi* (vale a dire se il fattore moltiplicativo è statisticamente significativo almeno per due concentrazioni adiacenti), è necessario ripetere la prova come indicato nella tabella 7, perfezionando le concentrazioni sperimentali prescelte. Le concentrazioni allestite per la seconda e terza corsa (se del caso) vanno adeguate sulla base dei risultati della prima, affinando le concentrazioni che hanno generato un effetto utilizzando una scala logaritmica 1/2-log (es.: se la prima corsa con 0,001 — 0,01 — 0,1 — 1 — 10 — 100 — 1 000 µM ha prodotto induzioni a 1 e 10 µM, le concentrazioni testate nella seconda corsa devono utilizzare 0,1 — 0,3 — 1, 3 — 10 — 30 — 100 µM), a meno che non sia necessario utilizzare concentrazioni più basse per determinare la LOEC. In quest'ultimo caso, nella seconda corsa vanno utilizzate almeno cinque concentrazioni inferiori alla concentrazione più bassa saggiata nella prima corsa usando una scala logaritmica 1/2-log. Se la seconda corsa non conferma la prima (ossia, se non si osserva una significatività statistica alla concentrazione già precedentemente saggiata con risultato positivo ± 1 incremento di concentrazione), occorre procedere a una terza corsa che utilizzi le condizioni sperimentali originali. I risultati ambigui della prima corsa sono considerati negativi qualora l'effetto osservato non abbia potuto essere confermato in nessuna delle due ulteriori corse. I risultati ambigui sono considerati risposte positive (effetti) quando una risposta può essere confermata in almeno una corsa successiva con un incremento ± 1 della concentrazione (cfr. paragrafo 55 per il protocollo di interpretazione dei dati).

Tabella 7

Matrice decisionale per possibili scenari di esito

Corsa 1	Corsa 2		Corsa 3		Decisione	
	Decisione	Scenario	Decisione	Scenario	Positivo	Negativo
Negativo	Confermare ^(a)	Negativo	Stop			X
Negativo	Confermare ^(a)	Positivo	Perfezionare ^(b)	Negativo		X
Ambiguo ^(c)	Perfezionare ^(b)	Negativo	Confermare ^(a)	Negativo		X
Ambiguo ^(c)	Perfezionare ^(b)	Negativo	Confermare ^(a)	Positivo	X	
Ambiguo ^(c)	Perfezionare ^(b)	Positivo			X	
Positivo	Perfezionare ^(b)	Negativo	Confermare ^(a)	Positivo	X	
Negativo	Confermare ^(a)	Positivo	Perfezionare ^(b)	Positivo	X	
Positivo	Perfezionare ^(b)	Positivo	Stop		X	

^(a) Confermare la corsa precedente utilizzando lo stesso disegno sperimentale.

^(b) Prova rieseguita con concentrazioni a intervalli logaritmici 1/2-log (affinando le concentrazioni che sono risultate significativamente diverse nella precedente corsa).

^(c) Il fattore moltiplicativo a una determinata concentrazione è diverso in modo statisticamente significativo rispetto al controllo con solvente.

Controllo di qualità della piastra sperimentale

48. Oltre a rispettare i criteri relativi alla piastra CQ, occorre osservare altri criteri di qualità (descritti nella tabella 8) che attengono alla variazione accettabile tra i pozzetti replicati, le corse replicate, la linearità e sensibilità dei sistemi di misura degli ormoni, la variabilità tra le misure degli ormoni replicate sullo stesso campione, e la percentuale di recupero delle quantità di ormoni addizionate dopo l'estrazione del terreno (se del caso; cfr. il paragrafo 30, relativo ai requisiti per l'estrazione). Per essere presi in considerazione nella valutazione successiva, i dati devono rientrare negli intervalli accettabili definiti per ciascun parametro. Se questi criteri non sono soddisfatti occorre annotare sul foglio elettronico che i criteri CQ non sono stati soddisfatti per il campione in questione, il quale sarà rianalizzato o eliminato dall'insieme dei dati.

Intervalli e/o variazioni accettabili (%) per i parametri della piastra del saggio su H295R.

LOQ: limite di quantizzazione del sistema di misura degli ormoni; CV: coefficiente di variazione; CS: controllo con solvente; DPM: disintegrazioni per minuto.

	Confronto tra	T	E2
Produzione basale di ormoni nei controlli con solvente.	Fattore moltiplicativo in rapporto al LOQ	≥ 5 volte	$\geq 2,5$ volte
Esperimenti di esposizione — CV intrapiastre per i CS (pozzetti replica)	Concentrazioni assolute	≤ 30 %	≤ 30 %
Esperimenti di esposizione — CV interpiastre per i CS (esperimenti replica)	Fattore moltiplicativo	≤ 30 %	≤ 30 %
Sistema di misura degli ormoni — sensibilità	Fattore di decremento rispetto al CS	≥ 5 volte	$\geq 2,5$ volte
Sistema di misura degli ormoni — CV delle misure replicate per i CS ^(a)	Concentrazioni assolute	≤ 25 %	≤ 25 %
Estrazione del terreno — Recupero dello standard interno 3H (se del caso)	DPM	≥ 65 % del nominale	

^(a) Si riferisce a misure replicate sullo stesso campione.

ANALISI DEI DATI E RELAZIONE

Analisi dei dati

49. Per valutare l'aumento relativo/la riduzione relativa della produzione di ormoni chimicamente alterati, occorre normalizzare i risultati sulla base del valore medio del controllo con solvente di ciascuna piastra ed esprimere i risultati sotto forma di cambiamento rispetto al controllo con solvente in ciascuna piastra. Tutti i dati sono espressi come valore medio ± 1 deviazione standard (SD).
50. Vanno inclusi nell'analisi dei dati solo quelli relativi agli ormoni dei pozzetti dove la citotossicità è attestata al di sotto del 20 %. Le variazioni relative sono calcolate come segue:

Variazione relativa = (concentrazione di ormoni in ciascun pozzetto) \div (concentrazione media di ormoni in tutti i pozzetti di controllo con solvente).

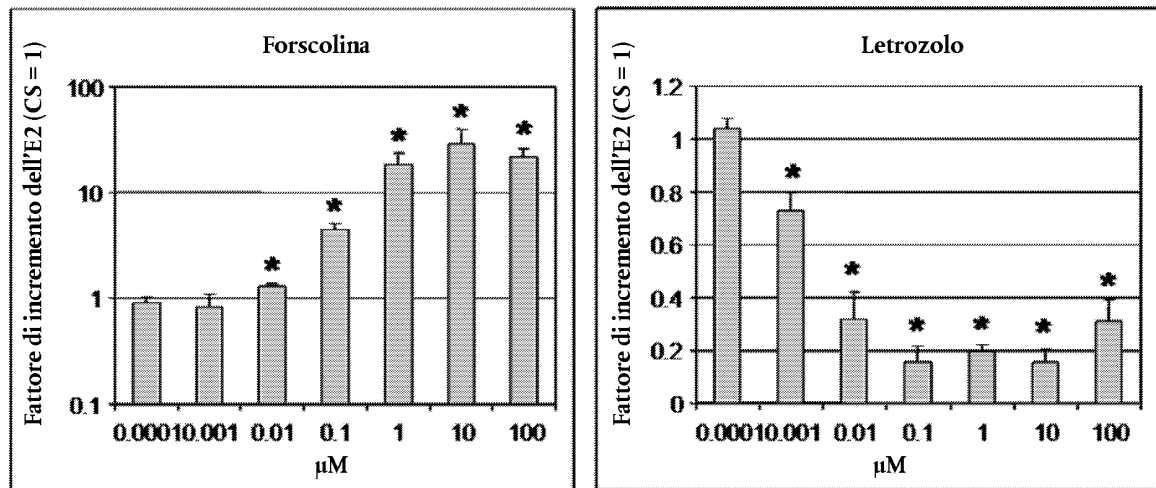
51. Se il controllo visivo del pozzetto o la prova di vitalità/citotossicità descritta al paragrafo 42 suggeriscono un probabile incremento del numero di cellule, questo apparente incremento va verificato. Se l'incremento viene comprovato, è necessario indicarlo nella relazione sulla prova.
52. Prima di condurre analisi statistiche, occorre valutare le ipotesi di normalità e omogeneità delle varianze. La normalità va valutata utilizzando un diagramma della probabilità standard o un altro metodo statistico adeguato (ad esempio il test di Shapiro-Wilk). Se la distribuzione dei dati (fattori moltiplicativi) non segue un andamento normale, si dovrà cercare di trasformare i dati in modo da approssimare una distribuzione normale. Se i dati sono distribuiti normalmente o si approssimano a una distribuzione normale, occorre analizzare le differenze tra i gruppi di concentrazioni della sostanza chimica e i controlli con solvente ricorrendo a un test parametrico (per esempio, il test di Dunnett), dove la *concentrazione* sarà la variabile indipendente e la *risposta* (fattore moltiplicativo) sarà la variabile dipendente. Se i dati non sono distribuiti normalmente, occorre utilizzare un test non parametrico adeguato (ad esempio, il test di Kruskal Wallis o il test di Steel ad uno o più ranghi). Le differenze sono considerate significative a $p \leq 0,05$. Le analisi statistiche vengono svolte sulla base dei valori medi per ciascun pozzetto, che rappresentano repliche indipendenti di dati. A causa degli intervalli importanti tra le dosi nella prima corsa (scala \log_{10}), bisogna prevedere che in molti casi non sia possibile descrivere una chiara relazione concentrazione-risposta dove le due dosi più elevate si situano nella parte lineare della curva sigmoide. Di conseguenza, per la prima corsa o per tutti gli altri insiemi di dati in casi simili (ad esempio, qualora non sia possibile stimare un'efficienza massima), si applicheranno metodi statistici a variabile fissa di tipo I, come indicato sopra.

53. Se almeno due punti di dati si trovano sulla parte lineare della curva e se è possibile calcolare l'efficacia massima — come si prevede sia possibile fare per seconde corse svolte utilizzando una scala semilogaritmica per spaziare le concentrazioni di esposizione — occorre utilizzare un modello probit o logit, oppure un altro modello di regressione per calcolare le concentrazioni efficaci (es. EC50 e EC20).
54. I risultati vanno forniti sia sotto forma di grafici (grafici a barre che rappresentano la media \pm 1 deviazione standard) sia di tabelle (LOEC/NOEC, direzione dell'effetto e entità massima della risposta nella parte dose-risposta dei dati; cfr., a titolo di esempio, la figura 3). La valutazione dei dati è considerata valida solo se basata su almeno due corse indipendenti. Un esperimento o una corsa sono considerati indipendenti se sono stati condotti in date diverse utilizzando una nuova serie di soluzioni e controlli. Il range di concentrazioni utilizzato nella seconda e terza corsa (se necessaria) può essere adattato in funzione dei risultati della prima corsa, per definire meglio l'intervallo dose-risposta contenente la LOEC (cfr. paragrafo 47).

Figura 3

Esempio di presentazione e valutazione dei dati ottenuti nel corso del saggio su H295R, sotto forma di grafico e tabella.

Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo con solvente ($p < 0,05$). LOEC: concentrazione minima alla quale si osserva un effetto significativo. Cambiamento massimo: entità massima della risposta osservata a una qualsiasi concentrazione rispetto alla risposta media dei controlli con solvente (= 1).



Sostanze chimiche	LOEC	Cambiamento massimo
Forscolina	0,01	0,15 volte
Letrozolo	0,001	29 volte

Protocollo per l'interpretazione dei dati

55. La sostanza chimica in esame è giudicata positiva se il fattore moltiplicativo d'induzione è statisticamente diverso ($p \leq 0,05$) dal controllo con solvente in due concentrazioni adiacenti, in almeno due corse indipendenti del saggio (tabella 7). La sostanza chimica in esame è giudicata negativa dopo due corse negative indipendenti oppure dopo tre corse delle quali due negative e una ambigua o positiva. Se i dati generati in tre esperimenti indipendenti non soddisfano i criteri decisionali elencati nella tabella 7, i risultati sperimentali non sono interpretabili. I risultati relativi a concentrazioni che superano il limite di solubilità o a concentrazioni citotossiche non vanno inclusi nell'interpretazione dei risultati.

Relazione sulla prova

56. La relazione comprende le seguenti informazioni:

Centro di saggio

- Nome del centro e ubicazione
- Responsabile dello studio e personale coinvolto, con le rispettive responsabilità
- Date di inizio e fine dello studio

Sostanza chimica in esame, reagenti e controlli

- Identità (nome/numero CAS, a seconda dei casi), origine, numero del lotto/della partita, purezza, fornitore, caratterizzazione della sostanza chimica in esame, dei reagenti e dei controlli
- Natura fisica e proprietà fisico-chimiche pertinenti della sostanza chimica in esame
- Condizioni di stoccaggio, metodo e frequenza di preparazione delle sostanze in esame, dei reagenti e dei controlli
- Stabilità della sostanza in esame

Cellule

- Origine e tipo di cellule
- Numero di passaggi (identificatore del passaggio delle cellule) per le cellule utilizzate nella prova
- Descrizione dei protocolli per la manutenzione delle colture cellulari

Requisiti pre-prova (se applicabili)

- Descrizione e risultati della prova di interferenza della sostanza chimica con la misura degli ormoni
- Descrizione e risultati delle misure dell'efficienza di estrazione degli ormoni
- Curve standard e di calibrazione per tutti i saggi analitici da effettuarsi
- Limiti di rivelazione per i saggi analitici selezionati

Condizioni sperimentali

- Composizione dei terreni di coltura
- Concentrazione della sostanza in esame
- Densità delle cellule (concentrazione delle cellule, stimata o misurata, a 24 e 48 ore)
- Solubilità della sostanza chimica in esame (limite di solubilità, se determinato)
- Tempo e condizioni di incubazione

Risultati della prova

- Dati grezzi per ciascun pozzetto per i controlli e le sostanze chimiche in esame — ogni misura replicata sotto forma dei dati originali forniti dallo strumento utilizzato per misurare la produzione di ormoni (ad esempio, densità ottica (OD), unità di fluorescenza, DPM ecc.)
- Validazione della normalità dei dati o spiegazioni riguardo alla loro trasformazione
- Risposte medie \pm 1 SD per ciascun pozzetto misurato
- Dati di citotossicità (concentrazioni sperimentali che hanno provocato citotossicità)
- Conferma dell'osservanza dei requisiti CQ
- Variazione relativa rispetto al controllo con solvente, corretta per la citotossicità
- Un grafico a barre indicante il cambiamento relativo (fattore moltiplicativo) a ciascuna concentrazione, la SD e la significatività statistica, come indicato ai paragrafi da 49 a 54

Interpretazione dei dati

- Applicare il protocollo di interpretazione dei dati ai risultati e discutere l'esito

Discussione

- Dallo studio condotto emergono indicazioni circa la possibilità che i dati sul T o sull'E2 potrebbero essere influenzati da effetti indiretti sulla via glucocorticoide e sulla via mineralcorticoide?

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in Appendix 2 to Chapter B.54 of this Annex
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. e Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., e Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.
- (4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Available at [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Disponibile qui: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Available at: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvsv/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
- (7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. e Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- (8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. e Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- (9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. e Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265-272.
- (10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. e Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- (11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. e La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- (12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. e Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- (13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. e Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- (14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. e Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- (15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. e Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731-737.
- (16) Capitolo B.55 del presente allegato: Saggio di Hershberger sul ratto: saggio di screening a breve termine delle proprietà (anti)androgeniche.
- (17) Shapiro, R., e Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- (18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.

- (19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
 - (20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.
-

DEFINIZIONI

Confluenza: copertura o proliferazione consentita alle cellule nel terreno di coltura.

Controllo della qualità (CQ): attuazione delle misure necessarie per garantire la validità dei dati.

Corsa: un esperimento indipendente caratterizzato da una nuova serie di soluzioni e di controlli.

CV: coefficiente di variazione, cioè il rapporto tra la deviazione standard di una distribuzione e la sua media aritmetica.

CYP: monoossigenasi del citocromo P450; una famiglia di geni e gli enzimi da essi prodotti, coinvolti nella catalisi di svariate reazioni biochimiche, inclusa la sintesi e il metabolismo degli ormoni steroidei.

DPM: disintegrazioni per minuto; numero di atomi in una determinata quantità di materiale radioattivo il cui decadimento avviene in un minuto.

E2: 17 β -estradiolo, l'estrogeno più importante nei sistemi dei mammiferi.

H295R: cellule umane di carcinoma surrenalico che hanno le caratteristiche fisiologiche delle cellule surrenali fetali umane zonalmente indifferenziate e che esprimono tutti gli enzimi della via steroidogenica. Si possono ottenere dall'ATCC.

Intervallo di linearità: intervallo nella curva standard di un sistema di misura degli ormoni dove i risultati sono proporzionali alla concentrazione dell'analita presente nel campione.

LOEC, Lowest Observed Effect Concentration: concentrazione minima alla quale, nell'ambito della prova, si osserva un effetto statisticamente significativo rispetto a un controllo con il solo solvente.

LOQ, Limit of quantification: limite di quantizzazione, ovvero la concentrazione più bassa di sostanza chimica che produce un segnale sufficientemente maggiore del bianco da poter essere rilevato, entro un determinato limite di confidenza. Al fine del presente metodo, il LOQ viene generalmente definito dal fabbricante del sistema sperimentale, salvo altre indicazioni.

NOEC, No Observed Effect Concentration: concentrazione senza effetti osservati, ovvero la più elevata concentrazione sperimentata alla quale la prova non fornisce una risposta positiva.

Passaggio: numero di volte in cui le cellule vengono divise dopo aver iniziato una coltura a partire da una soluzione congelata. Il passaggio iniziale dalla soluzione congelata è indicato come "passaggio 1". Le cellule divise una volta vengono indicate come "passaggio 2" ecc.

PBS: tampone fosfato salino di Dulbecco.

Piastra per il controllo della qualità: piastra a 24 pozzetti contenente due concentrazioni dei controlli positivi e negativi per sorvegliare le prestazioni di un nuovo lotto di cellule o per fornire i controlli positivi per la prova quando vengono testate delle sostanze chimiche.

Piastra sperimentale: la piastra sulla quale le cellule H295R vengono esposte alle sostanze in esame. Contiene il controllo con solvente e la sostanza chimica, in sette livelli di concentrazione e in triplicato.

Soluzione madre: base per la preparazione di altri reagenti. Consiste in una miscela 1:1 di DMEM (mezzo di Eagle modificato da Dulbecco) e di miscela nutriente Ham F-12 (DMEM/F12) in 15mM di tampone HEPES senza rosso di fenolo né bicarbonato di sodio. Il bicarbonato di sodio viene aggiunto come tampone, cfr. appendice II della relazione di validazione (4).

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

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Steroidogenesi: via metabolica che a partire dal colesterolo conduce alla produzione dei vari ormoni steroidei. Nella via metabolica degli steroidi intervengono diverse sostanze intermedie quali il progesterone e il testosterone che non solo sono importanti in sé ma che fungono anche da precursori degli ormoni sintetizzati a valle.

T: testosterone, uno dei due più importanti androgeni nei sistemi dei mammiferi.

Terreno di congelazione: mezzo utilizzato per congelare e conservare cellule congelate. È costituito da soluzione madre alla quale viene aggiunto del BD Nu-Serum e del dimetilsolfossido.

Terreno supplementato: soluzione con l'aggiunta di BD Nu-Serum e ITS+ Premix, cfr. appendice II della relazione di validazione(4).

Tripsina 1X: una soluzione diluita dell'enzima tripsina, una serina proteasi pancreatica, utilizzata per staccare le cellule da una piastra di coltura, cfr. appendice III della relazione di validazione (4).
