

Nuovo approccio sperimentale per gli studi in vivo sugli effetti cancerogeni e di interferenza endocrina per agenti chimici e fisici diffusi nell'ambiente.

New approach for experimental in vivo studies on the cancerogenic and endocrine disruptive effects of environmental chemical and physical agents.

Riassunto

Sono passati quasi 50 anni da quando gli studi a lungo termine sui roditori sono stati riconosciuti come parametro di riferimento per valutare gli effetti tossici cronici delle diverse sostanze chimiche, in particolare per la loro capacità di indurre tumori. Dopo tanto tempo, sia l'Agenzia Europea per la sicurezza degli Alimenti (EFSA) che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) hanno affermato che, a livello internazionale, le attuali linee guida metodologiche per testare la sicurezza dei composti chimici o agenti fisici non sono adeguate. Questo perché quando le linee guida furono stabilite e prodotte, gli agenti tossici erano presenti in prevalenza nei luoghi di lavoro, con esposizioni in ambienti circoscritti e ad alte dosi, iniziando dall'età adulta. Oggi non è più così. Infatti, le sostanze tossiche sono uscite dalle fabbriche attraverso i prodotti di consumo, con stoccaggio e trattamento dei prodotti di lavorazione spesso inadeguati, e quindi con l'accumulo di scorie nell'ambiente; cioè, nella pratica, una politica di salute ambientale non all'altezza della pressione della crescita industriale. Oggi possiamo parlare di tossicità diffusa nell'ambiente generale, aria, acqua, suolo. Le dosi sono generalmente basse, tranne in caso di incidenti, ma riguardano l'esposizione di tutta la popolazione della terra; inoltre, l'esposizione simultanea a molteplici agenti chimici e fisici in miscela fra di loro non è stata ancora studiata adeguatamente.

Le linee guida attuali, in generale, non comprendono alcuni test necessari per valutare effetti avversi correlati all'esposizione in età precoce (prenatale, neonatale, infantile) che si manifestano solo più tardi nel corso della vita. Questo è particolarmente vero per sostanze chimiche complesse come ad esempio i pesticidi.

Sulla base della lunga esperienza presso i laboratori dell'Istituto Ramazzini, abbiamo proposto già nel 2017 un progetto di studio integrato basato sulle linee guida esistenti, modificate per creare un modello il più possibile uomo-equivalente. Il disegno sperimentale proposto (Ramazzini Institute Design: RID) include gli obiettivi (end-point) prioritari delle linee guida OCSE e NTP per studiare cancerogenicità, tossicità cronica e tossicità per lo sviluppo e la riproduzione (studio dell'interferenza endocrina). Gli end-point tossicologici e le specifiche linee guida vengono integrati in un unico protocollo, così da ottimizzare l'uso degli animali in conformità con le 3R (sostituzione, riduzione e perfezionamento); allo stesso tempo, includendo le esposizioni prenatali, neonatali (compreso il periodo dell'allattamento) e valutando diversi parametri nel corso della vita, il RID possiede il potenziale di fornire dati sufficienti su più finestre di suscettibilità (Windows of susceptibility = WOS) per ogni end-point specifico, favorendo la valutazione del rischio e i processi decisionali in materia di salute pubblica. Il RID permette quindi, con la stessa coorte generazionale di ratti usati per la valutazione dei risultati a lungo termine, di monitorare attraverso gruppi satelliti paralleli biomarcatori ed altri parametri relativi a risposte specifiche, comprese le alterazioni metaboliche, neurologiche e i disturbi endocrini.

Parole chiave: sperimentazione animale, ratto, linee guida, benessere animale

Abstract

It has been almost 50 years since long-term studies in rodents have been recognised as a benchmark for assessing the chronic toxic effects of different chemicals, in particular their ability to induce

FIORELLA BELPOGGI

Direttrice Scientifica Emerita dell'Istituto Ramazzini

Per corrispondenza:
belpoggif@ramazzini.it

cancer. After a so long time, both the European Food Safety Agency (EFSA) and the World Health Organisation (WHO) have affirmed that, internationally, the current methodological guidelines for testing the safety of chemical compounds or physical agents are not adequate. This is because when the guidelines were evaluated and produced the toxic agents were present mainly in the workplace, with exposure in confined environments and at high doses, starting from adulthood. This is no longer the case. In fact, toxic substances have come out of factories through consumer products, with inadequate processing for storage and treatment, and therefore with the accumulation of slag in the environment, that is, in practice, an environmental health policy not up to the pressure of industrial growth. Today we can talk about widespread toxicity in the general environment, air, water, soil. Doses are generally low, except in the case of accidents, but involve exposure of the entire population of the earth. Furthermore, the effects of the exposure to low doses of multiple chemical in mixtures are not yet adequately explored.

Current guidelines, in general, do not include some tests necessary to assess adverse effects related to exposure at an early age (prenatal, neonatal, infancy) that occur only later in life. This is particularly true of complex chemicals such as pesticides.

Based on our experience at the laboratories of the Ramazzini Institute, we proposed already in 2017 an integrated study project based on the existing guidelines. The proposed experimental design (Ramazzini Institute Design: RID) includes the objectives of the OECD and NTP guidelines to study carcinogenicity, chronic toxicity and developmental and reproductive toxicity (endocrine interference study). With the integration of a complete set of toxicological end-points in a single protocol, the use of animals is optimized in accordance with 3R (replacement, reduction and refinement); at the same time, including prenatal, neonatal exposures (lactation period) and by evaluating different parameters throughout life, the integrated experimental design has the potential to provide sufficient data on multiple windows of susceptibility (WOS) for each specific test, promoting good risk assessment and public health decision-making. The integrated RID allows, with the same generation cohort of rats used for the evaluation of long-term results, to monitor biomarkers and other parameters related to specific responses in parallel satellite groups, including metabolic changes, neurological and endocrine disorders.

Keywords: *Animal experiments, rat, guidelines, animal welfare*

■ Introduzione

Circa 140.000 sostanze sintetiche sono state prodotte e utilizzate sia singolarmente che come miscele, con un intenso sviluppo dopo la Seconda guerra mondiale¹. Per millenni l'uomo aveva commercializzato composti chimici naturali, valutandone la sicurezza direttamente in maniera empirica sul consumatore. I primi test biologici per identificare le sostanze chimiche che potrebbero

rappresentare un pericolo in termini di cancerogenesi per gli esseri umani sono stati sviluppati circa 100 anni fa. La rivoluzione della cancerogenesi chimica iniziò quando fu dimostrato che il catrame di carbone applicato alle orecchie dei conigli causava carcinomi cutanei². Il vero impulso per la sperimentazione di sostanze chimiche è avvenuto con l'approvazione della legislazione, prima negli Stati Uniti nel 1976 e poi in diversi Stati membri dell'Unione europea, che imponeva la valutazione delle sostanze chimiche industriali, in particolare quelle presenti sul posto di lavoro e diffuse nei prodotti di consumo. Si è avuto così uno sforzo multinazionale per armonizzare i test attraverso il programma ambientale dell'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE). Negli ultimi 40 anni sono state così sviluppate diverse linee guida nell'ambito dell'OCSE³⁻¹³. I saggi sperimentali sui roditori sono stati descritti nell'OCSE Test Guideline (TG) 453¹⁴ e nell'U.S. National Toxicology Program¹⁵, con note specifiche per la progettazione e l'esecuzione di studi per valutare negli animali da laboratorio il potenziale tossico e cancerogeno di sostanze chimiche, agenti biologici e fisici. Tenendo conto che un ratto/topo mediamente ha una vita di circa 3 anni, paragonabili a circa 90 anni nell'uomo) e che la cancerogenesi è un processo complesso che si svolge in più fasi¹⁶⁻¹⁸ e con una lunga, anche lunghissima latenza, come nel caso dell'amianto, risulta abbastanza inadeguato un disegno sperimentale per la cancerogenesi della durata di 2 anni, pretendendo che possa fornire tutti i dati complessi necessari per l'identificazione del rischio di cancro, per gestirne i risultati e in seguito attivare tutte le decisioni normative che ne derivano. Le attuali linee guida dell'OCSE non sono state pianificate per monitorare i pericoli di esposizioni in individui particolarmente sensibili come bambini, immunodepressi, anziani. Solo il protocollo NTP di 2 anni per gli studi di cancerogenicità può includere l'esposizione prenatale, sulla base di modelli di esposizione che si verificano abitualmente nell'uomo¹⁹.

I metodi utilizzati nei test di tossicità tradizionali applicati in passato non sono riusciti a mettere in evidenza molti degli effetti endocrini avversi per alcune sostanze chimiche, in particolare gli effetti specifici per i diversi stadi di sviluppo²⁰⁻²⁷, come è ad esempio accaduto per il bisfenolo A²⁸⁻³⁰. Facendo seguito a queste considerazioni, sia l'OCSE che il NTP hanno introdotto nuove linee guida per la tossicità riproduttiva e dello sviluppo con end-point più adatti a valutare come i diversi agenti influenzano lo stato riproduttivo ed endocrino degli animali^{31,32}.

Nella tabella 1 sono riassunti i piani di studio e gli end-point compresi nelle attuali linee guida, confrontati con il nostro protocollo integrato sulla cancerogenicità e tossicità cronica e sulla tossicità riproduttiva e dello sviluppo.

Durante l'arco della vita degli animali, per soddisfare la necessità di considerare eventuali effetti multipli (ad esempio, lesioni neoplastiche e non neoplastiche) cor-

relati all'esposizione e per ridurre il numero complessivo di animali necessari per valutare i diversi end-point, le linee guida tradizionali per la cancerogenesi sono state integrate con le più recenti proposte dell'OCSE e del NTP per studiare la tossicità riproduttiva e lo sviluppo. Questo nuovo piano sperimentale integrato mira a massimizzare il monitoraggio dei diversi end-point in ciascun animale, riducendo così il numero complessivo di animali generati e utilizzati, in conformità con le 3R (sostituzione, riduzione e perfezionamento)³³.

Per una chiara comprensione di questo protocollo, si dovrebbe considerare che 16 settimane di età nei ratti corrispondono approssimativamente a 10 anni nell'uomo³⁴. Nella nostra proposta, gli animali appartenenti al braccio di studio tossicità cronica-cancerogenicità sono osservati fino a 130 settimane di età (corrispondente a circa 75-80 anni di età negli esseri umani) e l'esposizione inizia durante la vita fetale (12° giorno di gravidanza); va considerato che le linee guida dell'OCSE stabiliscono che gli animali iniziano l'esposizione in età adulta e dovrebbero essere abbattuti ed esaminati dopo 104 settimane di trattamento, corrispondenti a circa 60-65 anni di età nell'uomo³⁵. Va inoltre considerato che l'80% dei tumori insorge, sia nel ratto che negli esseri umani, dopo questa età e che quindi il potenziale cancerogeno di una sostanza nelle condizioni indicate dalle linee guida OCSE non viene esplorato completamente, anzi viene ignorato il periodo di vita di incidenza maggiore in cui predisposizione genetica, età ed esposizione a sostanze tossiche trovano la loro concomitante espressione con lo sviluppo del cancro.

Il progetto sperimentale integrato qui proposto e al quale si fa riferimento, è rappresentato in **Figura 1**. Maggiori dettagli su ogni sezione specifica del protocollo sono disponibili nel Materiale Supplementare, del lavoro originale "Manservigi F, Babot Marquillas C, Buscaroli A, Huff J, Lauriola M, Mandrioli D, Manservigi M, Panzacchi S, Silbergeld EK, Belpoggi F. 2017. An integrated experimental design for the assessment of multiple toxicological end points in rat bioassays. *Environ Health Perspect* 125:289-295; <http://dx.doi.org/10.1289/EHP419>"³⁶.

■ Modello animale

Il ratto albino è stato utilizzato come modello animale privilegiato per l'identificazione e la valutazione dei rischi per la salute umana. Il ratto è stato ampiamente utilizzato per la ricerca in materia di fisiologia dello sviluppo e della riproduzione, di endocrinologia e di cancerogenesi; è stato caratterizzato in modo più approfondito in questi settori di ricerca rispetto ad altre specie³⁷⁻³⁹.

La nostra proposta di utilizzare ratti Sprague-Dawley (SD) si basa sull'evidenza che sono adeguatamente sensibili, hanno una lunga storia di utilizzo negli studi di ricerca, e sono raccomandati anche dall'OCSE e dal NTP; sono utilizzati da molte università e organizzazioni. I ratti SD sono inoltre conosciuti e accettati come un mo-

dello uomo-equivalente per il cancro.

■ Disegno sperimentale del protocollo RID

Il disegno dello studio è in gran parte basato su OCSE TG 453 (modificato solo per la durata dell'esperimento), OCSE TG 443, Linee guida NTP. Lo studio comprende le seguenti componenti:

Studio di cancerogenicità e tossicità cronica.

Gli animali sono trattati dalla vita fetale (fattrici, 12° giorno di gravidanza) fino a 104 settimane di età, quindi osservati (con o senza esposizione continua, a seconda della sostanza chimica) fino a 130 settimane di età (30 mesi). Sono inclusi i sacrifici intermedi per ottenere informazioni sulla progressione delle eventuali lesioni non neoplastiche o neoplastiche, oltre che informazioni meccanicistiche (ad esempio, espressione genica, biomarcatori sierici dell'infiammazione, proliferazione cellulare, ecc). Anche gli animali destinati alla valutazione intermedia sono esposti dalla vita fetale (madri, dodicesimo giorno di gravidanza) e fino a 26, 52, 78 e 104 settimane di età secondo le linee guida dell'OCSE.

Tossicità riproduttiva e dello sviluppo.

L'obiettivo è quello di studiare diverse finestre di suscettibilità (WOS) relative alla riproduzione e allo sviluppo e ad altri effetti non neoplastici. I possibili effetti avversi sono studiati nelle diverse WOS (prenatale, neonatale, prepuberale, puberale e adulto) oltre che in femmine nullipare e primipare, i diversi gruppi vengono confrontati tra loro e con i controlli e, per ogni dose, con il possibile effetto cancerogeno evidenziato a lungo termine.

Per il protocollo OCSE TG 453 (cancerogenicità e tossicità cronica) il numero minimo di animali contemplato è 480; per il TG 443 (riproduzione, sviluppo, neurotossicità, immunotossicità) dell'OCSE, il numero minimo di animali è 1.760; per lo studio di riproduzione e sviluppo NTP MOG, il numero è 3.200 animali. Eseguire questi studi separatamente, come è pratica corrente, richiede fino a 3.680 animali (**Tabella 1**).

Al fine di evitare effetti dovuti alla familiarità, nella nostra proposta i genitori di circa 10-15 settimane di età (maschi e femmine vergini ottenuti da un incrocio outbred, cioè evitando parenti), sono accoppiati in un numero adeguato così da ottenere un numero della progenie sufficiente per lo studio. L'obiettivo è infatti quello di generare un numero sufficiente di animali per poter disporre di non più di una sorella e di un fratello per ogni gruppo sperimentale, sia di controllo che esposto (due sorelle e due fratelli nel braccio di studio di cancerogenesi), annullando così l'evenienza di patologie familiari concentrate in uno stesso gruppo.

Studiando almeno tre gruppi di esposizione più il controllo, il numero per uno studio con protocollo integrato come quello proposto è di 1.720 animali (figura 1 e tabella 1). Il numero piuttosto elevato per gruppo sperimentale rispetto a quanto richiesto dalle linee guida offre una maggiore sensibilità del modello, una potenza

statistica sufficiente, e soprattutto consente di salvare animali che sarebbero stati sacrificati nel caso di una inutile ripetizione degli studi o per l'esecuzione di studi inadeguati per numero e poco informativi.

Per verificare e comprendere gli effetti in seconda generazione, la prole F2 generata da femmine primipare adulte F1 viene esaminata e sacrificata al PND 28.

In conformità con le 3R, è consigliabile evitare l'uso dell'eliminazione di cuccioli ritenuti non idonei per caratteristiche fuori dalla media, e di utilizzare invece tutti i cuccioli generati durante l'esperimento, evitando inutili sacrifici di animali. È nostra opinione che evitare l'abbattimento permetterebbe in generale anche una misura più rigorosa della mortalità degli animali, simulando in maniera più precisa uno scenario equivalente umano, con una maggiore variabilità genetica ed evitando possibili distorsioni di selezione (ad esempio selezionando solo animali sani con peso alla nascita più elevato).

Durante l'autopsia, i tessuti bersaglio congelati (incluso il sangue) e gli organi, insieme ai tessuti inclusi in paraffina, vengono conservati per studi istopatologici e di biologia molecolare, effetti di interferenza endocrina, neurotossicità, cambiamenti biochimici e bio-ematologici (metabolismo) e lesioni tossiche e preneoplastiche.

End-point aggiuntivi ed effetti avversi del composto studiato.

L'obiettivo del nostro progetto sperimentale integrato è di studiare tutti o la maggior parte dei possibili effetti sulla salute legati all'esposizione all'agente studiato e di ridurre al minimo l'utilizzo inutile di animali da esperimento. Il nostro disegno evita anche lo spreco di tempo quando vengano approntati studi sugli stessi parametri, ma in maniera sequenziale. I parametri valutati nei test tossicologici tradizionali sono il consumo di cibo e acqua, il monitoraggio delle dosi del composto studiato, la perdita e l'aumento di peso, la patologia clinica, la sopravvivenza e la mortalità, le variazioni del peso degli organi, le malattie preneoplastiche e neoplastiche con analisi istopatologiche. Tuttavia, molte sostanze chimiche esaminate hanno dimostrato di causare effetti complessi negli animali di laboratorio, che influenzano lo sviluppo degli organi e provocano cambiamenti funzionali e comportamentali³¹. Per valutare al meglio questi parametri fondamentali, abbiamo incluso nel protocollo integrato diversi end-point delle linee guida NTP MOG e OCSE TG 443 per studiare l'immunotossicità, la neurotossicità e la tossicità per lo sviluppo e la riproduzione. Va notato che questo protocollo è facilmente adattabile (ad esempio, possono essere aggiunti altri gruppi, oppure gruppi specifici possono essere modificati se studiati in precedenza); semplici modifiche sono fattibili per analizzare specifici end point o tessuti (ad esempio aneuploidia spermatica) che non siano descritti nel protocollo integrato.

■ Conclusioni

Il nostro progetto sperimentale permette di valutare una serie di effetti avversi di interesse su una popolazione relativamente ampia di animali (di potenza sufficiente), nati nello stesso periodo da genitori non parenti fra loro, randomizzati e studiati per eventuali effetti avversi dose correlati, evitando al massimo fattori esterni confondenti (identico trattamento per animali di controllo e trattati, valutazione dei risultati della biofase in cieco, randomizzazione, valutazione istopatologica in cieco da parte di un minimo di due valutatori, ecc). Tipicamente, per studiare tutti i parametri precedentemente menzionati (finestre di suscettibilità, fertilità, sviluppo, tossicità, cancerogenicità), vengono eseguiti circa 10-20 studi, utilizzando più animali, in laboratori diversi, con procedure diverse. Il nostro modello sperimentale e il disegno sperimentale proposto nell'insieme superano queste molteplici carenze e consentono di raccogliere maggiori informazioni su parametri tossici, meccanicistici e biologici, utilizzando un minor numero di animali complessivi in un esperimento ampio, ma unico. Infatti, nel nostro progetto sperimentale, i ratti della stessa generazione sono usati per studiare la tossicità cronica e la cancerogenicità, ma allo stesso tempo sono distribuiti negli esperimenti paralleli satellite per altri end-point, minimizzando le variabili fra i diversi bracci dell'indagine.

Il risparmio di animali è notevole. Il nostro protocollo sperimentale integrato richiede 1.720 animali. Con le linee guida OCSE e NTP per lo studio degli stessi parametri verrebbero utilizzati fino a 3680 animali. Si registra quindi una riduzione fino al 53% nell'uso di animali rispetto a test separati, risparmiando vite animali in conformità con le 3R (Tabella 1). Si può inoltre ottenere un'importante riduzione in termini di tempo, in quanto la realizzazione di un singolo esperimento integrato richiede un tempo più breve per la progettazione, l'approvazione, le prestazioni e l'analisi rispetto a fasi disgiunte di studio in esperimenti diversi non comparabili fra loro per le differenze del sistema biologico in sé (specie e ceppi diversi) nonché delle metodologie dei diversi laboratori. Tutto questo inoltre comporta un vantaggio da un punto di vista economico, in quanto verrebbero ridotti i costi e migliorerebbe la disponibilità di dati complessi e integrabili per la valutazione del rischio. Questo protocollo rappresenta quindi una concreta proposta per i ricercatori e soprattutto per gli scienziati coinvolti nel processo di regolamentazione. Poter raccogliere informazioni sufficienti e rapide su diversi effetti avversi in un protocollo unico costituisce un importante passo avanti per la protezione della salute pubblica⁴⁰.

Bibliografia

- 1) Landrigan P et al : The Lancet Commission on pollution and health. Lancet 2018; 391: 462-512. Published Online October 19, 2017.
- 2) Yamagiwa K, Ichikawa K. 1918. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. Cancer Res 3(1):1-29.
- 3) Hartung T, Rovida C. 2009. Chemical regulators have overreached.

- Nature 460:1080–1081.
- 4) Huff J. 1992. Design strategies, results and evaluations of long-term chemical carcinogenesis studies. *Scand J Work Environ Health* 18(suppl1):31–37.
 - 5) Maltoni C. 1976. Occupational carcinogenesis. Predictive value of carcinogenesis bioassays. *Ann N Y Acad Sci* 271:431–443.
 - 6) Haseman J, Melnick R, Tomatis L, Huff J. 2001. Carcinogenesis bioassays: study duration and biological relevance. *Food Chem Toxicol* 39:739–744.
 - 7) Soffritti M, Belpoggi F, Minardi F, Maltoni C. 2002. Ramazzini Foundation cancer program: history and major projects, life-span carcinogenicity bioassay design, chemicals studied, and results. *Ann N Y Acad Sci* 982:26–45.
 - 8) Tomatis L. 1979. The predictive value of rodent carcinogenicity tests in the evaluation of human risks. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 19:511–530.
 - 9) Maltoni C, Soffritti M, Belpoggi F. 1999. The scientific and methodological bases of experimental studies for detecting and quantifying carcinogenic risks. *Ann N Y Acad Sci* 895:10–26.
 - 10) Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D. 2006. Cancer prevention: the lesson from the lab. In: *Cancer Medicine at the Dawn of the 21st Century: The View from Bologna*. Biasco G, Tanneberger S, eds. Bologna, Italy: Bononia University Press, 49–64. http://www.ramazzini.org/wp-content/uploads/2008/03/Cancer-Prevention_the-lesson-from-the-lab_2006.pdf [accessed 18 April 2016].
 - 11) Silbergeld EK, Mandrioli D, Cranor CF. 2015. Regulating chemicals: law, science, and the unbearable burdens of regulation. *Annu Rev Public Health* 36:175–191.
 - 12) Mandrioli D, Silbergeld EK. 2016. Evidence from toxicology: the most essential science for prevention. *Environ Health Perspect* 124:6–11, doi: 10.1289/ehp.1509880.
 - 13) Maronpot RR, Flake G, Huff J. 2004. Relevance of animal carcinogenesis findings to human cancer predictions and prevention. *Toxicol Pathol* 32(suppl 1):40–48.
 - 14) OECD. 2009. Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris, France: OECD Publishing. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071223-en> [accessed 30 June 2023].
 - 15) NTP. 2011b. Specifications for the Conduct of Studies to Evaluate the Toxic and Carcinogenic Potential of Chemical, Biological and Physical Agents in Laboratory Animals for the National Toxicology Program (NTP). Research Triangle Park, NC: National Institutes of Health, National Institute of Environmental Health Sciences, NTP. https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/test_info/finalntp-toxcarspecsjan2011.pdf [accessed 5 June 2023].
 - 16) Brash D, Cairns J. 2009. The mysterious steps in carcinogenesis. *Br J Cancer* 101:379–380.
 - 17) Melnick RL, Thayer KA, Bucher JR. 2008. Conflicting views on chemical carcinogenesis arising from the design and evaluation of rodent carcinogenicity studies. *Environ Health Perspect* 116:130–135, doi:10.1289/ehp.9989.
 - 18) Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
 - 19) NTP. 2016. Toxicology/Carcinogenicity. <http://ntp.niehs.nih.gov/testing/types/cartox/index.html> [accessed 10 June 2023].
 - 20) Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT, eds. 2012. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemical – 2012: An Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors Prepared by a Group of Experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization. <http://unep.org/pdf/9789241505031eng.pdf> [accessed 30 June 2023].
 - 21) Bergman Å, Becher G, Blumberg B, Bjerregaard P, Bornman R, Brandt I, et al. 2015. Manufacturing doubt about endocrine disrupter science—a rebuttal of industry-sponsored critical comments on the UNEP/WHO report “State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012.” *Regul Toxicol Pharmacol* 73:1007–1017.
 - 22) Birnbaum LS. 2013. State of the science of endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* 121:A107, doi:10.1289/ehp.1306695.
 - 23) Huff J. 1996. Chemically induced cancers in hormonal organs of laboratory animals and of humans. *Prog Clin Biol Res* 394:77–102.
 - 24) Huff J, Boyd J, Barrett JC. 1996. Hormonal carcinogenesis and environmental influences: background and overview. *Prog Clin Biol Res* 394:3–23.
 - 25) Manservigi F, Gopalakrishnan K, Tibaldi E, Hysi A, Iezzi M, Lambertini L, et al. 2015. Effect of maternal exposure to endocrine disrupting chemicals on reproduction and mammary gland development in female Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol* 54:110–119.
 - 26) Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, et al. 2002. Summary of the National Toxicology Program’s report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ Health Perspect* 110:427–431.
 - 27) Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, et al. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33:378–455.
 - 28) Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol* 254–255:179–186.
 - 29) Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. 2009. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30:75–95.
 - 30) vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, et al. 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol* 24:131–138.
 - 31) NTP (National Toxicology Program). 2011a. NTP’s Modified One-Generation Studies. <https://ntp.niehs.nih.gov/testing/types/mog/index.html> [accessed 10 June 2023].
 - 32) OECD. 2011. Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris, France: OECD Publishing. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264122550-en> [accessed 30 June 2023].
 - 33) European Union. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the*
 - 34) Sengupta P. 2013. The laboratory rat: relating its age with human’s. *Int J Prev Med* 4:624–630
 - 35) Huff J, Jacobson MF, Davis DL. 2008. The limits of two-year bioassay exposure regimens for identifying chemical carcinogens. *Environ Health Perspect* 116:1439–1442, doi: 10.1289/ehp.10716.
 - 36) Manservigi F, Babot Marquillas C, Buscaroli A, Huff J, Lauriola M, Mandrioli D, Manservigi M, Panzacchi S, Silbergeld EK, Belpoggi F. 2017. An integrated experimental design for the assessment of multiple toxicological end points in rat bioassays. *Environ Health Perspect* 125:289–295; <http://dx.doi.org/10.1289/EHP419>
 - 37) Gray LE Jr, Wilson V, Noriega N, et al. 2004. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. *ILAR J* 45:425–437.
 - 38) Maltoni C, Soffritti M, Belpoggi F. 1999. The scientific and methodological bases of experimental studies for detecting and quantifying carcinogenic risks. *Ann N Y Acad Sci* 895:10–26.
 - 39) Teitelbaum SL, Belpoggi F, Reinlib L. 2015. Advancing research on endocrine disrupting chemicals in breast cancer: expert panel recommendations. *Reprod Toxicol* 54:141–147.
 - 40) Robinson C. 2012. Time to bring risk assessment into the real world. Research Europe. London, UK; 26 January 2012. https://www.researchgate.net/profile/Claire_Robinson3/publication/258412098_Time_to_bring_risk_assessment_into_the_real_world/links/00b495282726336f64000000.pdf?origin=publication_detail [accessed 31 August 2023]

Fonte	N. di animali	WOS/coorte	Inizio del trattamento	Fine del trattamento (settimane)	Età all'autopsia (settimane)	Generazione	Issue						
							DRF	Teratogenesi	Tossicità subcronica	Tossic. cronica	Riprod. e sviluppo	Neuro Tossic.	Neuro-Comport.
OECD TG 453	480	Toss. cronica /cancerogenesi	6-8 sett.	104	108	F1	X	-	X	X	-	-	-
		Riproduzione (1A)	2 sett. PB	13	13	F0, F1							
		Riproduzione (1B)	2 sett. PB	14 or 20-25 if triggered*	14 or 20-25 if triggered*	F0, F1, F2 if triggered*							
OECD TG 443	1760*	Neuro-comportamentale(2A)	2 sett. PB	11-12	11-12	F0, F1	X	-	-	X	X	X	X
		Neuro-tossicità (2B)	2 sett. PB	3	3	F0, F1							
		Immuno-tossicità (3)	2 sett. PB	8	8	F0, F1							
NTP MOG	3200*	Riproduzione	GD 6	22	22	F0, F1, F2							
		Prenatale/Teratogen.	GD 6	18	18	F1, F2							
		13-week	GD 6	18	18	F1		X	X	-	X	-	X
		Sviluppo/Neurotossicità	GD 6	11	11	F1							
		Sviluppo/Immunotossicità	GD 6	8	8	F1							
		Animali totali (OECD 453+OECD 443 or NTP MOG): Da 2240 a 3680 contro il massimo di 2.140 nel RID											
RI	2140*	Toss. cronica/ cancerogenesi	GD 12	104	130 (sacrificio finale)	F1							
		Prenatale	Incrocio	nascita	3	F1							
		Postnatale	PND 1	3	3	F1	X	-	X	X	X	X	X
		Pre-Puberale	3 sett.	6	6	F1							
		Puberale	6 sett.	9	9	F1							
		Adulti	PND 1	26	26	F1, F2							

* Key: DRF=Dose range finding; F0=genitori; F1=prima generazione; F2= seconda generazione GD=giorno di gestazione, PB=prima dell'incrocio; PND=giorno post natale

Tabella 1. Confronto fra le linee guida NTP e OECD per studi in vivo e il disegno sperimentale proposto per gli stessi end-point. Fonte N. di animali Issue

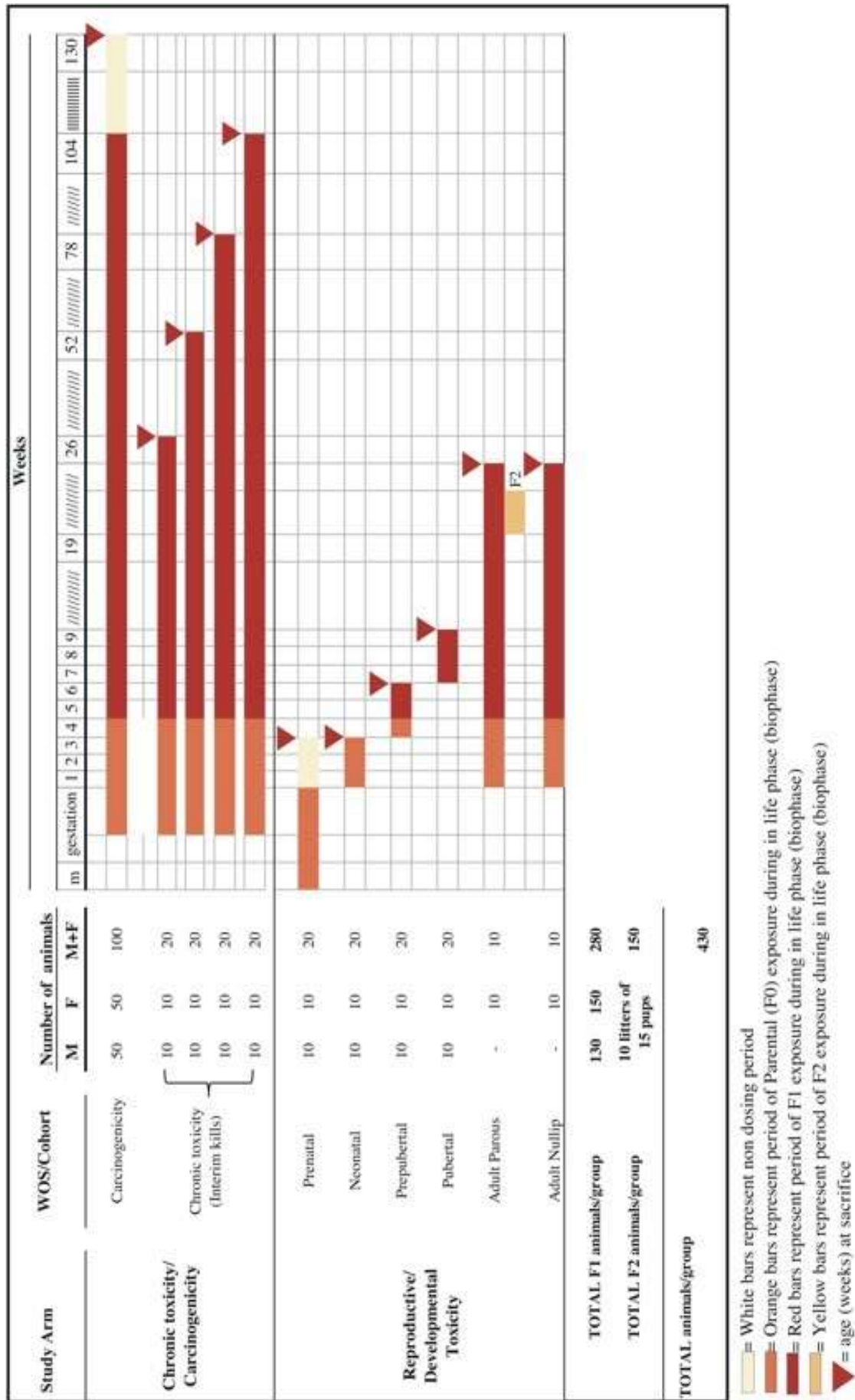


Figura 1. Rappresentazione grafica della proposta di disegno sperimentale integrato (RID)