

Istituto superiore per la Ricerca e la
Protezione Ambientale



Ministero del Lavoro, Salute e
Politiche Sociali

In collaborazione con:

Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

Ministero dello Sviluppo Economico

Istituto Superiore di Sanità

Cenni di epidemiologia e valutazione del rischio

Annamaria Colacci

Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente
Emilia Romagna

5. Cenni di epidemiologia



Epidemiologia: definizione

E' la scienza che studia la distribuzione delle malattie nella popolazione, correlandola alle caratteristiche degli individui o del loro ambiente

Un po' di storia

- Nata per descrivere l'insorgenza e l'evoluzione delle malattie infettive
 - John Snow 1854: epidemia di colera di Londra
- Ha spesso precorso la scoperta di fattori importanti per la salute
 - Golberger 1915: diffusione della pellagra
- Nei tempi piu' recenti ha avuto una importanza fondamentale per determinare le cause di patologie cronico-degenerative
 - Tumori
 - Patologie cardio-vascolari

Misure di frequenza di malattia

- Prevalenza (P)
 - rapporto fra il numero di individui affetti da malattia in uno specifico momento per il numero di individui che costituiscono la popolazione nel medesimo momento
- Incidenza cumulativa (CI)
 - rapporto fra il numero di individui che contraggono la malattia durante uno specifico periodo di tempo e il numero di individui che costituiscono la popolazione a rischio all'inizio del periodo
- Tasso di incidenza (I)
 - rapporto fra il numero di nuovi casi di malattia in una popolazione durante un definito periodo di tempo e la somma dei singoli periodi di tempo in cui ciascun individuo della popolazione è stato a rischio di contrarre la malattia

Misure di frequenza di malattia

- Prevalenza (P)
 - Un gruppo di popolazione viene esaminata allo stesso momento e vengono identificati i malati
 - Esempio
 - Popolazione femminile esaminata = 1038 *persone* in eta' compresa fra 70 e 74 anni
 - Numero soggetti affetti da artrite reumatoide = 70
 - $P = 70/1038 = 0,07$
 - La prevalenza dell'artrite reumatoide nella popolazione di eta' compresa fra 70 e 74 anni e' di 0.07

Misure di frequenza di malattia

- Incidenza cumulativa (CI)
 - rapporto fra il numero di individui che contraggono la malattia durante uno specifico periodo di tempo e il numero di individui che costituiscono la popolazione a rischio all'inizio del periodo
 - Entrambi i gruppi all'inizio del periodo sono sani
 - Esempio
 - Numero lavoratori esposti alle materie plastiche 3076
 - Numero di soggetti che hanno sviluppato tumore nell'arco di tempo di osservazione (13 anni) = 11
 - $CI = 11/3076 = 0.004$

Misure di frequenza di malattia

- Tasso di incidenza (I)
 - rapporto fra il numero di nuovi casi di malattia in una popolazione durante un definito periodo di tempo e la somma dei singoli periodi di tempo in cui ciascun individuo della popolazione è stato a rischio di contrarre la malattia

Sensibilità e specificità

- Sensibilità
 - probabilità che un individuo malato venga classificato come malato (assenza di falsi negativi)
- Specificità
 - probabilità che un individuo sano venga classificato come sano (assenza di falsi positivi)

Disegno dello studio

- Studio caso-controllo
 - si ottengono le informazioni relative a tutti i casi di malattia che si verificano nella popolazione in studio, durante un definito periodo di tempo.
 - Il gruppo di confronto costituito da “controlli” viene selezionato come un campione rappresentativo dell’intera popolazione in studio

Disegno dello studio

- Studio di coorte
 - due categorie (es. esposti e non esposti)
 - più categorie (es. non esposti, poco esposti, molto esposti)
 - Sperimentale
 - l'esposizione viene assegnata dal ricercatore in accordo ad un protocollo
 - Non sperimentale
 - basato su esposizioni già esistenti

Disegno dello studio

- Studio caso-controllo

	Esposti		Totale
	Sì	No	
Casi	53	43	96
Controlli	53	85	138

$$RR = (53/43) / (53/85) = 1,98$$

Gli odds e gli studi retrospettivi

- termine che non ha un corrispondente in italiano
 - può essere reso con "probabilità a favore"
- corrisponde al rapporto fra il numero di volte in cui l'evento si verifica (o si è verificato) ed il numero di volte in cui l'evento non si verifica (o non si è verificato)
- E' un termine preso dal mondo delle scommesse

Risultati dello studio retrospettivo

variabile dipendente (malattia)

	urolitiasi si	urolitiasi no	
obesità si	383 (a)	322 (b)	705 esposti
obesità no	631 (c)	1165 (d)	1796 non esposti
	1014	1487	2501
	casi	controlli	

variabile indipendente ("esposizione")

Odds ratio = $\frac{\text{odds di esposizione nei casi}}{\text{odds di esposizione nei controlli}}$

Odds ratio = $\frac{a / c}{b / d} = \frac{a}{b} * \frac{d}{c} = \frac{ad}{bc}$

dove

	sì malattia	no malattia
sì esposizione	a	b
no esposizione	c	d

Disegno dello studio

- Studio caso-controllo

	Esposti		
	Sì	No	Totale
Casi	a	b	N_1
Controlli	c	d	N_0

Disegno dello studio

- Studio caso-controllo
 - Retrospektivo
 - rapporto tra gli odds (Odds Ratio = OR)
 - Prospettico
 - stima del rischio relativo (RR)

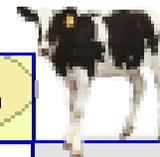
$$RR = ad / bc$$

$$RR = I_1 / I_0$$

Risultati dello studio prospettivo

variabile dipendente (malattia)

	polmonite sì	polmonite no		
allev. chiuso	240 (a)	230 (b)	470	esposti
allev. aperto	160 (c)	1070 (d)	1230	non esposti
	400	1300	1700	
	casi	controlli		



variabile indipendente ("esposizione")

$$\text{Rischio relativo} = \frac{\text{incidenza negli esposti}}{\text{incidenza nei non esposti}}$$

$$\text{Rischio relativo} = \frac{a / (a+b)}{c / (c+d)} \quad \text{dove}$$

	sì malattia	no malattia
sì esposizione	a	b
no esposizione	c	d

Disegno dello studio

- Un valore <1 indica una associazione negativa (cioè il fattore può *proteggere* dalla malattia)
- un rapporto >1 indica l'esistenza di una associazione positiva (il fattore può *causare* la malattia).
- prima di dichiarare l'esistenza di un rapporto causa-effetto tra l'esposizione e la malattia
 - Bisogna eseguire un test di significatività statistica (per escludere che la differenza sia dovuta al caso)
 - Verificare i *criteri di causalità*.

Schema di interpretazione del rischio relativo e dell'odds ratio.

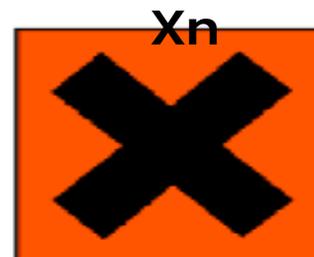


Classificazione dei cancerogeni: UE

- Categoria 1
 - Sostanze note per gli effetti cancerogeni per l'uomo. Esistono prove sufficienti per stabilire un nesso causale tra l'esposizione dell'uomo ad una sostanza e lo sviluppo dei tumori
- Categoria 2
 - Sostanze che dovrebbero considerarsi cancerogene per l'uomo. Esistono elementi sufficienti per ritenere verosimile che l'esposizione dell'uomo ad una sostanza possa provocare lo sviluppo di tumori in base a:
 - adeguati studi a lungo termine effettuati su animali
 - altre informazioni specifiche
- Categoria 3
 - Sostanze da considerare con sospetto per i possibili effetti cancerogeni sull'uomo per le quali, tuttavia, le informazioni disponibili non sono sufficienti per procedere ad una valutazione soddisfacente. Esistono alcune prove ottenute da adeguati studi sugli animali che non bastano tuttavia per classificare la sostanza nella categoria 2.

Classificazione dei cancerogeni: Frase di Rischio (UE)

- **Categorie 1 e 2**
 - R45 Può provocare cancro
 - R 49 Può provocare cancro per inalazione
- **Categoria 3**
 - R40 Evidenza limitata di effetti cancerogeni



Sostanze e processi ritenuti sicuramente cancerogeni per l'uomo: Agenti Chimici

- Aflatossine
- 4-Amminobifenile
- Arsenico e derivati
- Asbesto
- Azatioprina
- Benzene
- Benzidina
- Bisclormetiletere (e clormetilmetiletere tecnico)
- Catrame di carbone
- Clornafezina
- Clorambucil
- Ciclofosfamide
- Ciclosporina
- Cloruro di vinile
- Contraccettivi orali combinati
- Contraccettivi orali sequenziali
- Cromo esavalente
- Dietilstilbestrolo
- Berillio e suoi composti
- Cadmio e suoi composti
- Erionite
- Estrogeni non steroidei
- Estrogeni usati in terapia sostitutiva
- Fuliggini
- Gas mostarda
- Melfalano
- Metil-CCNU
- Metossalene + UV-A
- Miscela analgesiche contenenti fenacetina
- MOPP e altre chemioterapie combinate contenenti alchilanti
- Myleran
- 2-Naftilammia
- Nichel e suoi composti
- Oli minerali non trattati o semitrattati
- Olio di scisto
- Ossido di etilene
- Pece di catrame
- Talco contenente fibre di asbesto
- Treosulfan
- Tiotepa

Sostanze e processi ritenuti sicuramente cancerogeni per l'uomo: Processi Industriali

- Estrazione di ematite dal sottosuolo con esposizione al radon
- Fonderie (ferro e acciaio)
- Industria della gomma
- Produzione di alcool isopropilico
- Produzione di alluminio
- Produzione di auramina
- Produzione di carbon coke
- Gasificazione del carbone
- Produzione di magenta
- Produzione di mobili e armadietti
- Produzione e riparazione calzature
- Verniciatura (esposizione occupazionale)
- Esposizione professionale a miscele di acidi inorganici forti contenenti acido solforico
- Polvere di legno

Sostanze e processi ritenuti sicuramente cancerogeni per l'uomo: Agenti Biologici

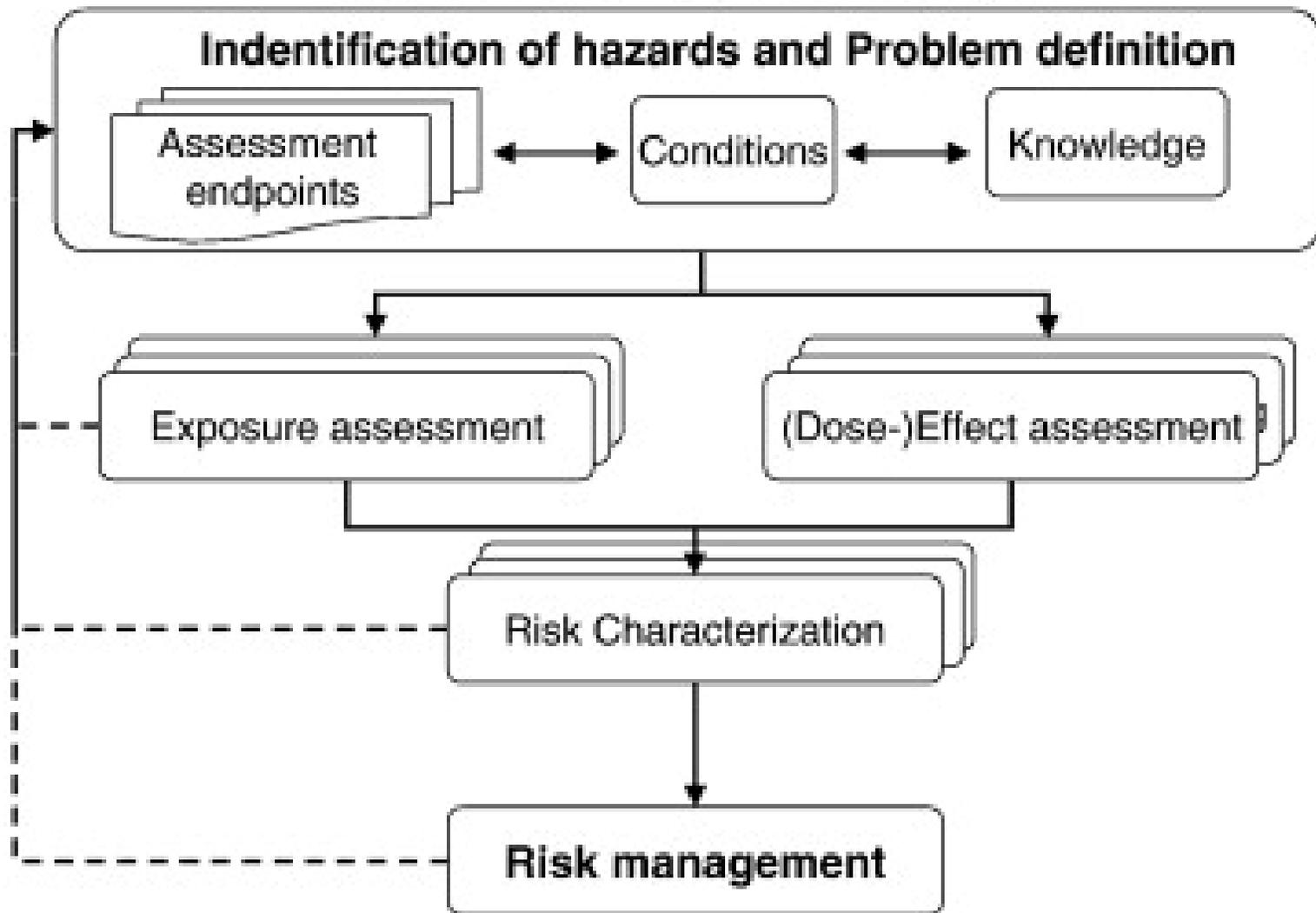
- Infezione cronica con il virus dell'epatite B
- Infezione cronica con il virus dell'epatite C
- Infezione con *Schistosoma haematobium*
- Infezione con *Opisthorchis viverrini*
- Infezione con *Helicobacter pylori*
- Infezione con papilloma virus 16 (HPV 16)
- Infezione con papilloma virus 18 (HPV 18)

Sostanze e processi ritenuti sicuramente cancerogeni per l'uomo: Agenti Fisici

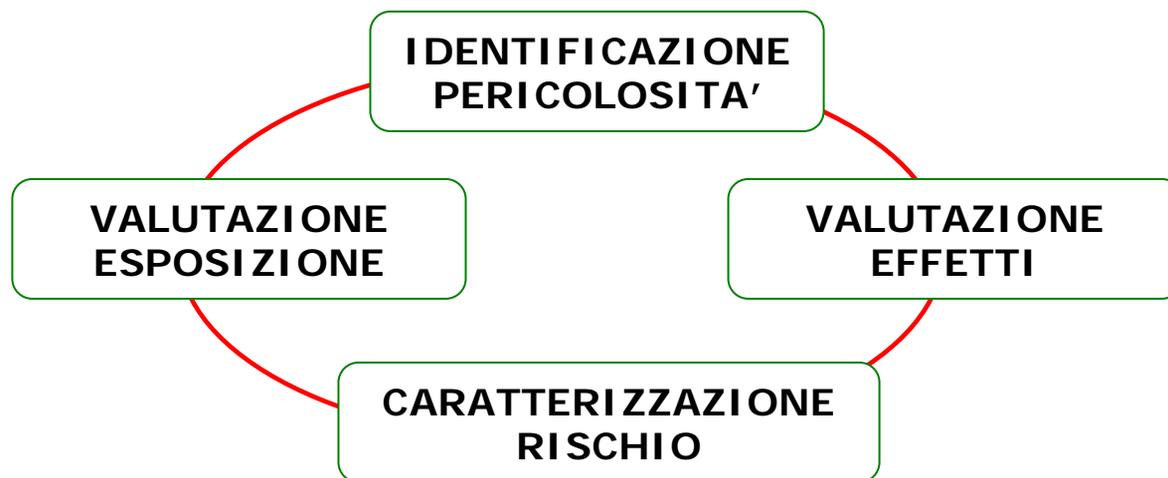
- Radiazione solare
- Radon e suoi prodotti di decadimento

6. L'aspetto quantitativo della stima di rischio

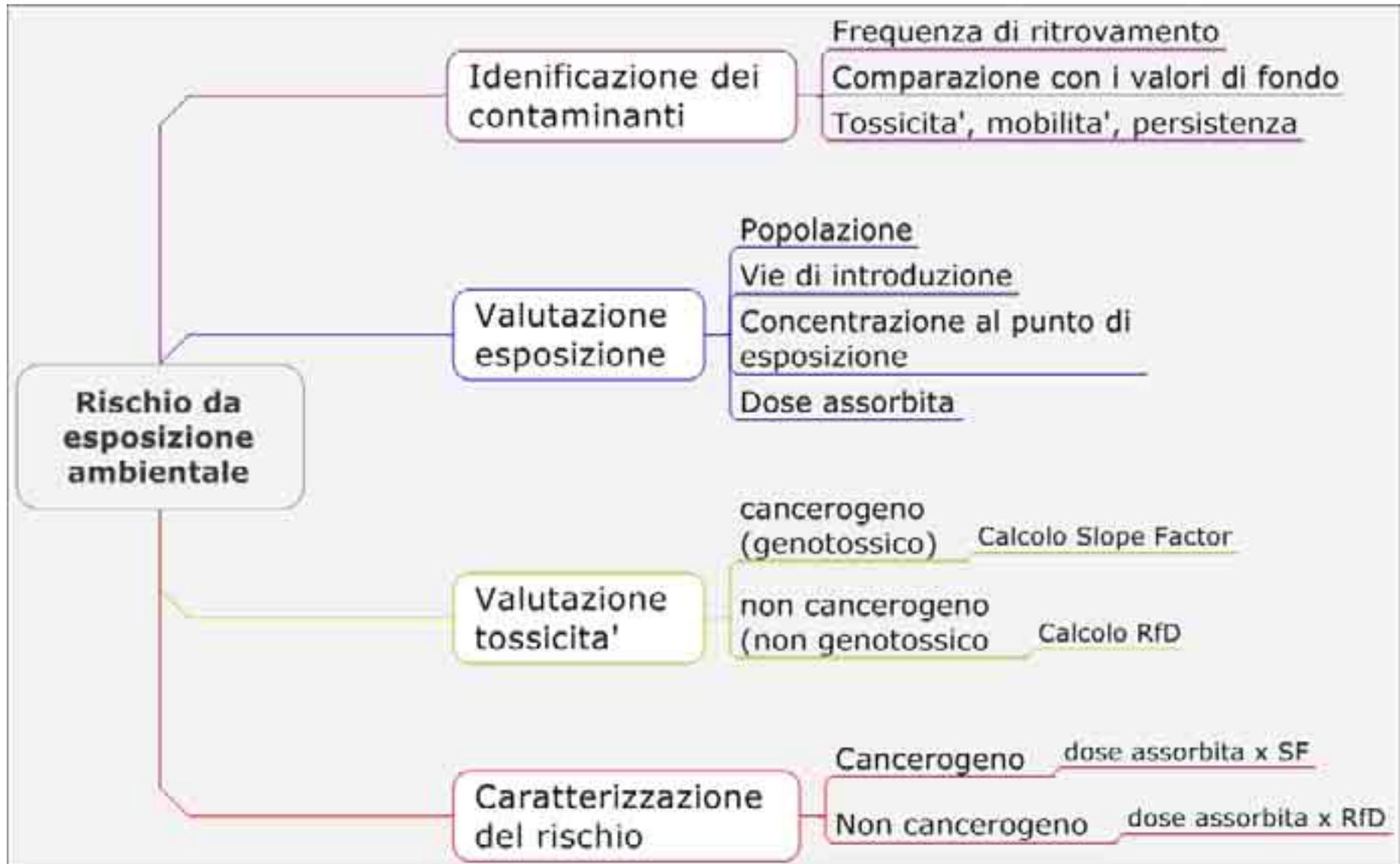
Universal risk paradigm



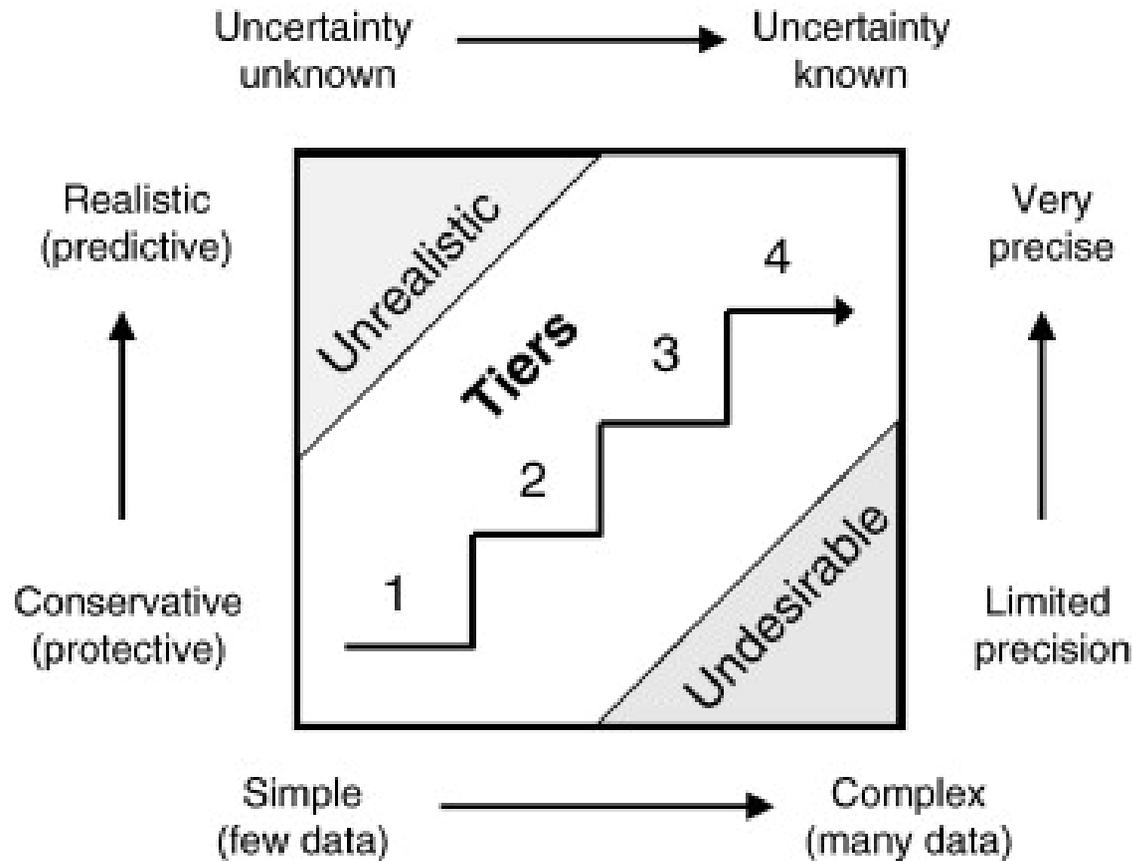
Rischio da esposizione



Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



Tossicità' e rischio

- Tossicità
 - Capacità di una sostanza di causare danno
 - Aspetto qualitativo
- Rischio
 - Probabilità che un danno si verifichi
 - Aspetto quantitativo
 - Condizioni di esposizione
 - Riduzione assorbimento
- Valutazione rischi-benefici

Tossicità e rischio: le definizioni secondo l'OCSE

- **Toxicity (= tossicità)**
 - Capacità intrinseca di un composto chimico o di una miscela di sostanze di indurre danno
- **Hazard (= pericolosità)**
 - Manifestazioni tossiche osservate indotte una quantità nota di una sostanza in condizioni note di esposizione
 - Tossicità intrinseca
- **Risk (rischio)**
 - Probabilità che un pericolo (o più pericoli) identificato(i) si possa realizzare in condizioni di esposizione prevedibili

 - Risk = Hazard x Exposure

OECD definition (original)

- Toxicity
 - means the intrinsic capacity of a chemical substance or a mixture of substances to induce injury.
- Hazard
 - means the observed toxic manifestation(s) induced by a known quantity of a substance under known exposure conditions.
 - The term is frequently used interchangeably with “intrinsic toxicity”.
- Risk
 - means the probability that an identified hazard or hazards will or will not be encountered under anticipated exposure conditions.³
The basic approach to risk assessment can be expressed by the simple formula:
 - Risk = Hazard x Exposure

Valutazione del rischio

- Tossicologia della molecola o miscela in esame (dati qualitativi e quantitativi)
 - Tossicità acuta e cronica
 - Mutagenesi
 - Cancerogenesi
 - Tossicità riproduttiva
- Scenari di esposizione

ESPOSIZIONE

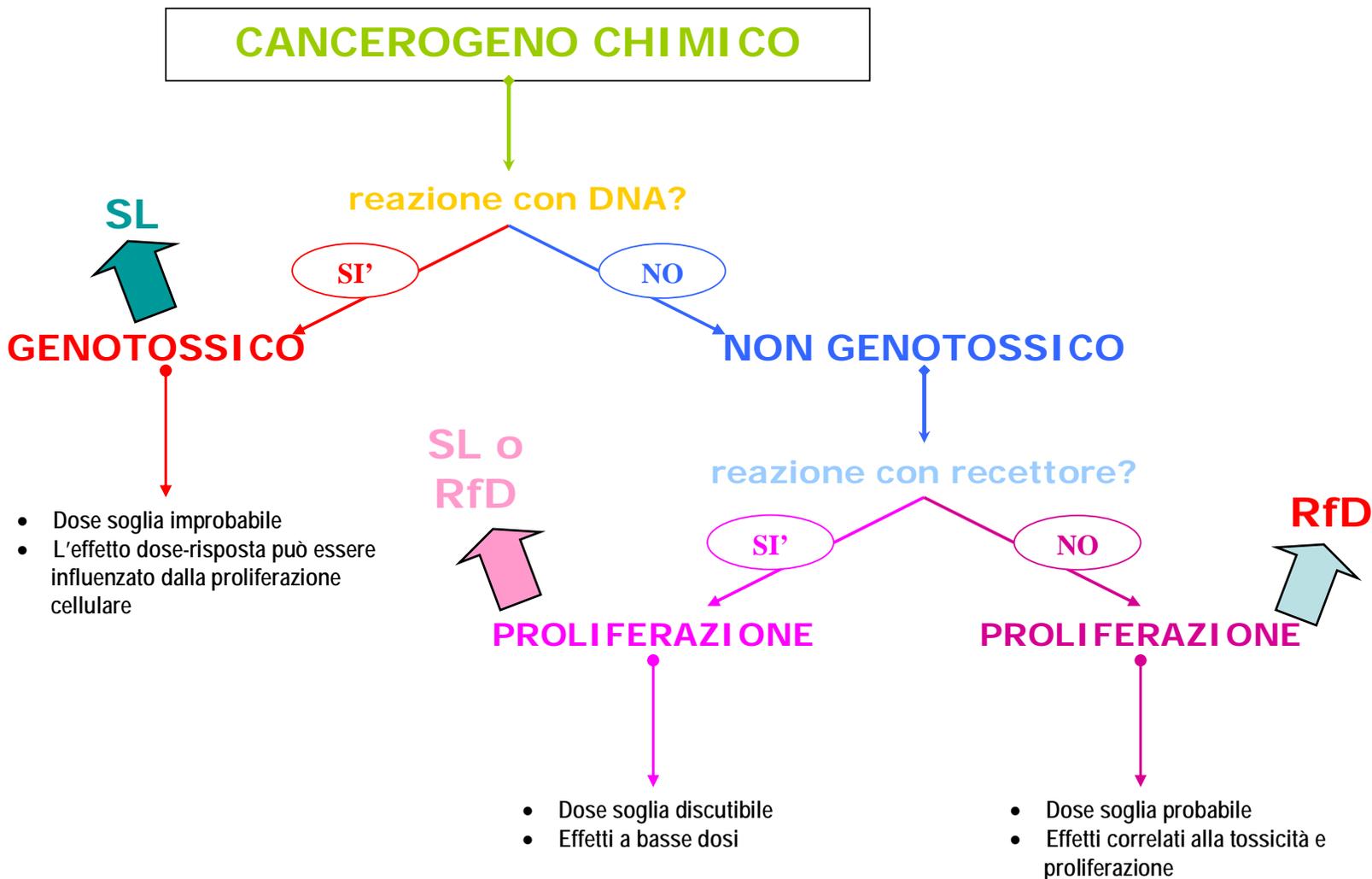
- CR rappresenta la portata ingerita, inalata o a contatto [l/d; m³/d; kg/d];
 - EF rappresenta la frequenza di esposizione [d/y];
 - ED rappresenta la durata dell'esposizione [y];
 - BW rappresenta il peso corporeo [kg] riferito all'uomo (cui si fa riferimento per il calcolo dell'esposizione cronica);
 - AT rappresenta il periodo su cui è mediata l'esposizione [d].
 - sostanze cancerogene
 - dose mediata sulla durata media della vita (AT=70 anni),
 - sostanze non cancerogene
 - mediata sull'effettivo periodo di esposizione (AT=ED);
 - BIO è la biodisponibilità
- $E = \frac{CR \times EF \times ED \times BIO}{BW \times AT}$ composto che entra in circolo nel corpo.

$$E = \frac{CR \times EF \times ED \times BIO}{BW \times AT}$$

Tipologie di esposizione

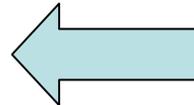
- Ingestione del suolo
- Contatto dermico con suolo
- Ingestione dell'acqua di falda
- Assunzione dermica in doccia
- Inalazione in doccia
- Inalazione di aria in un luogo aperto
- Inalazione di aria in un ambiente chiuso
- Ingestione di acqua di superficie
- Contatto dermico con acqua di superficie
- Ingestione di vegetali coltivati in un suolo contaminato
- Ingestione di vegetali irrigati con acqua di falda
- Ingestione di acqua di irrigazione
- Contatto dermico con acqua di irrigazione
- Inalazione di spray di acqua di irrigazione

Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH

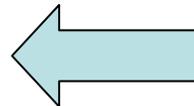


Stima del rischio cancerogeno relazioni dose-risposta

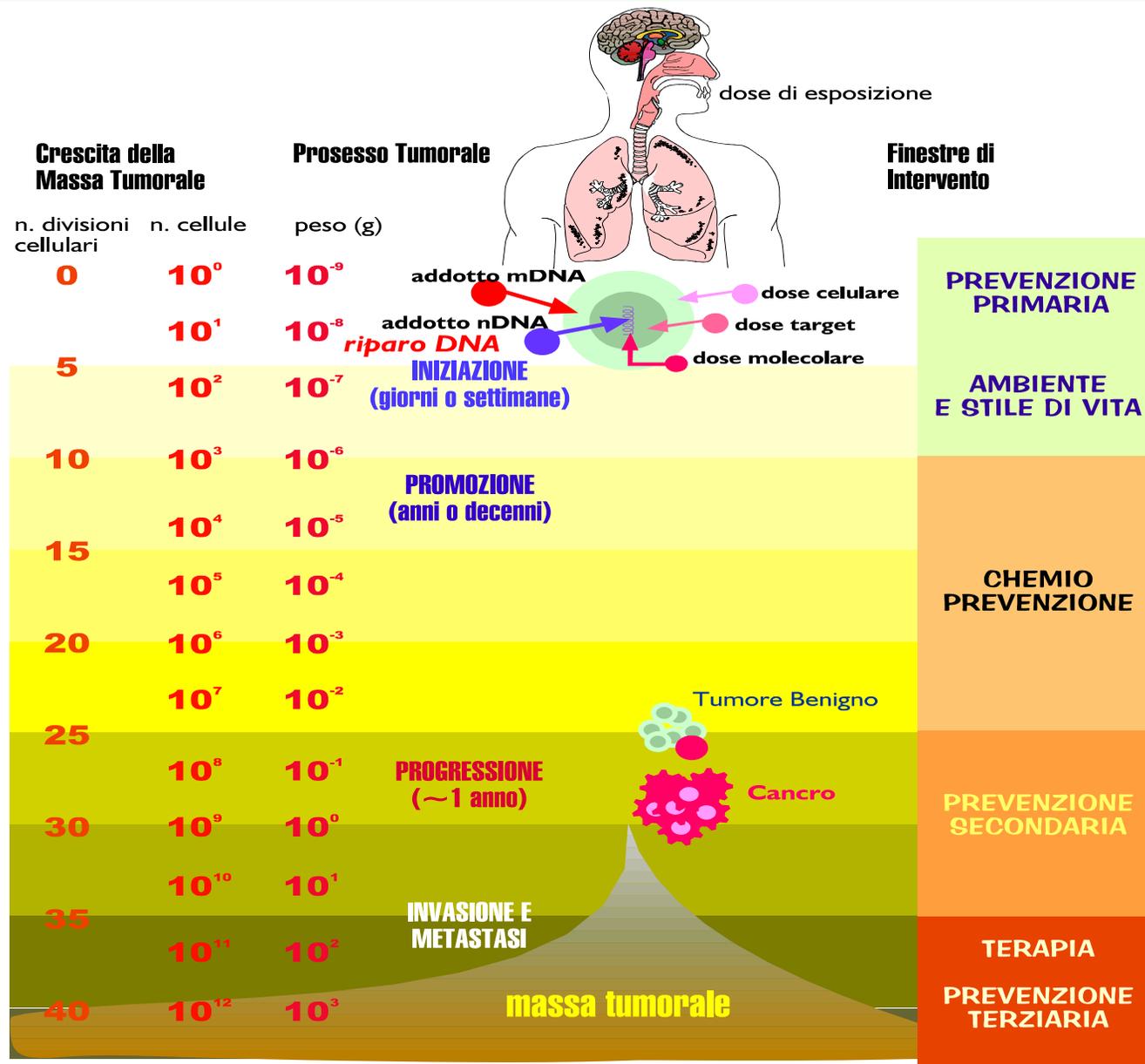
- La dose è definita come dose media ponderata per una esposizione pari alla durata della vita
- Ci si riferisce a:
 - dose applicata
 - cute
 - via orale
 - dose di esposizione
 - inalazione



Non corrispondono
alla dose assorbita
(interna)

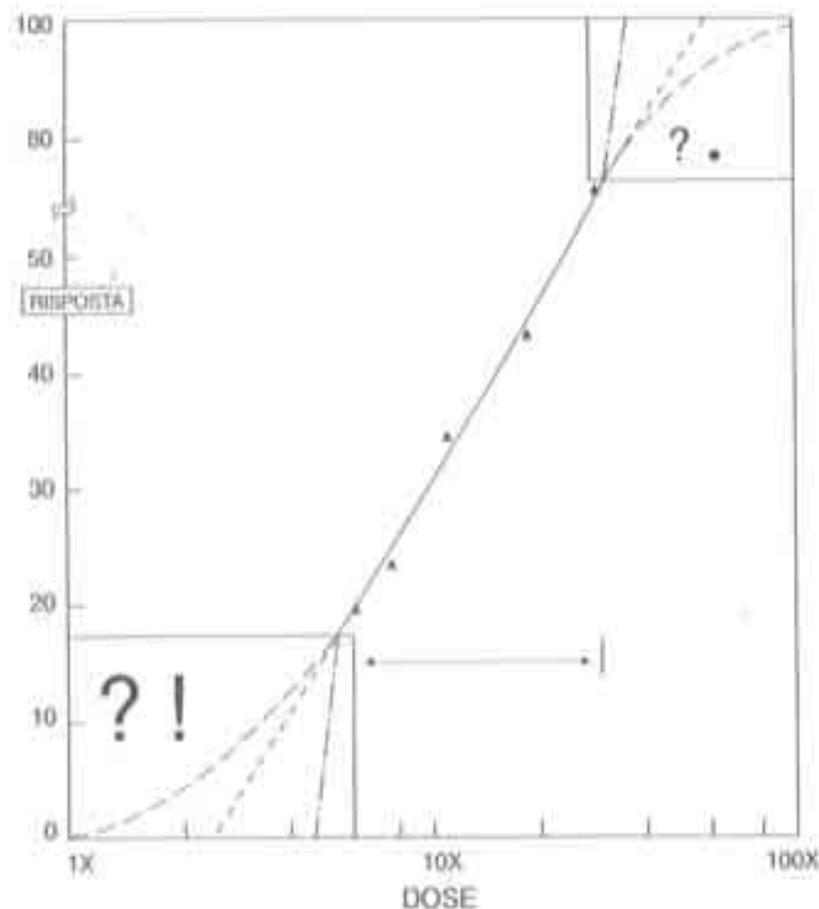


Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



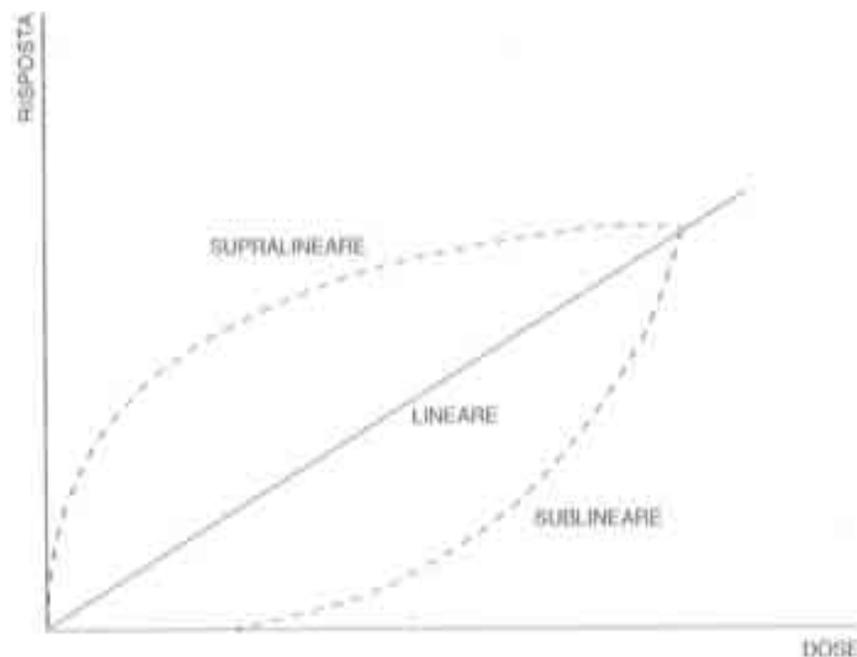
Stima del rischio cancerogeno relazioni dose-risposta

- Problematiche
 - estrapolazione dalle dosi alte alle dosi basse
 - estrapolazione tra specie differenti
- La popolazione generale è generalmente esposta a basse dosi.
- I dati sull'animale sono ottenuti a dosi alte



Stima del rischio cancerogeno relazioni dose-risposta

- Problematiche
 - dose-risposta alle basse dosi
 - lineare
 - sublineare (a soglia)
 - supralineare



Modelli matematici per
estrapolazione rischio

Modelli meccanicistici

A singola interazione

Modello gamma ad
interazione multipla

A stadi multipli
(Armitage-Doll)

A stadi multipli
linearizzato

Modello stocastico a due
stadi
(Moolgavkar-Venson-Knudson)

Modelli statistici o di
distribuzione

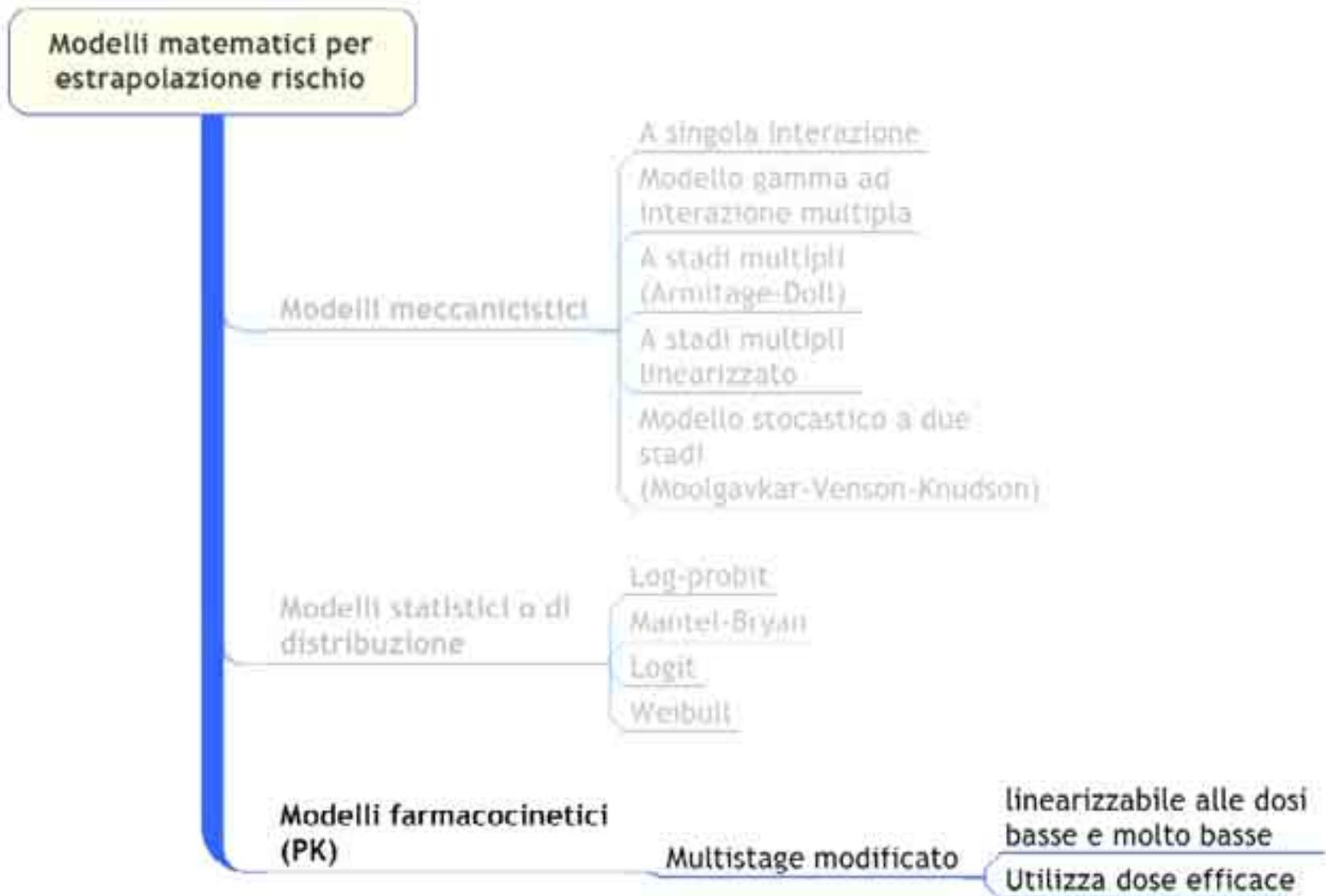
Log-probit

Mantel-Bryan

Logit

Weibull

Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



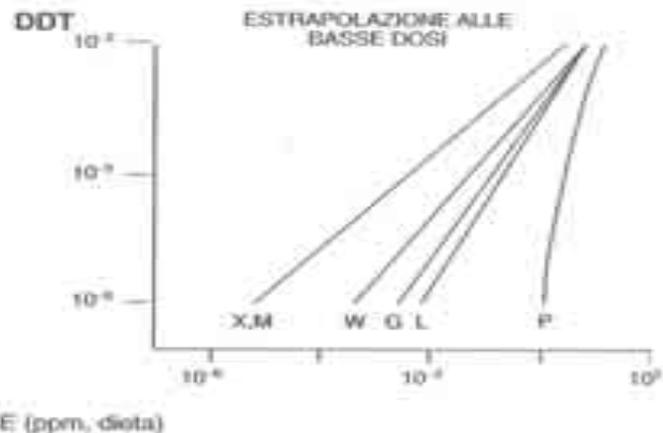
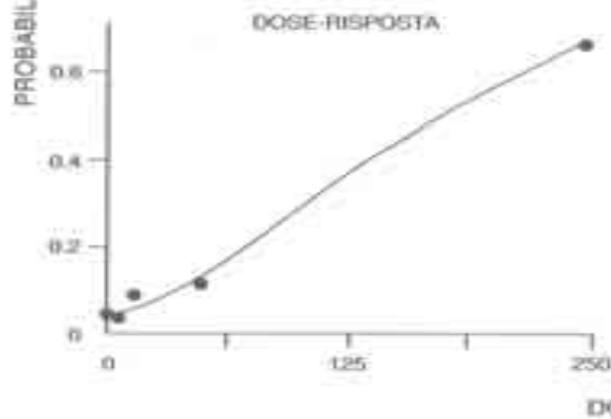
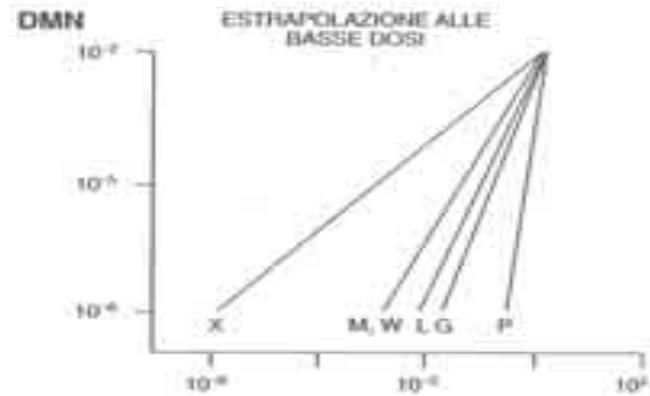
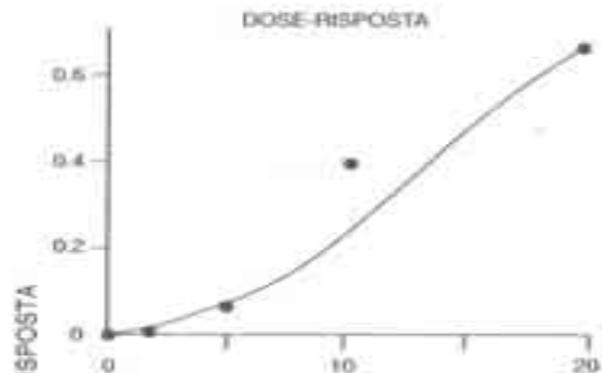
Modelli matematici utilizzati per l'estrapolazione del rischio

Parametri fisiologici considerati nel modello PB-PK

Parametro	Topo	Ratto	Uomo
Peso corporeo (kg)	0.024	0.25	70
Superficie corporea (m ²)	0.006	0.03	1.8
Rapporto superficie/peso	0.3	0.15	0.0257
Metabolismo basale (kJ/kg)	711	615	105
Ventilazione alveolare (l/hr)	1.3	8	354
Velocità del flusso ematico (l/hr)	1.3	5.2	372
Frazione flusso ematico			
Fegato	0.25	0.25	0.25
Grasso	0.09	0.09	0.05
Organi	0.51	0.51	0.51
Tessuto muscolare	0.15	0.15	0.19
Frazione flusso ematico			
Fegato	0.06	0.04	0.04
Grasso	0.10	0.07	0.20
Organi	0.05	0.05	0.05
Tessuto muscolare	0.70	0.75	0.62
Pulsazioni cardiache/min	520-780	300-500	70-72
Assunzione acqua (l/die)	0.006	0.025	1-2

Modelli matematici utilizzati per l'estrapolazione del rischio

Curva dose-risposta secondo il modello Weibull ed estrapolazione alle basse dosi basata su 6 diversi modelli matematici

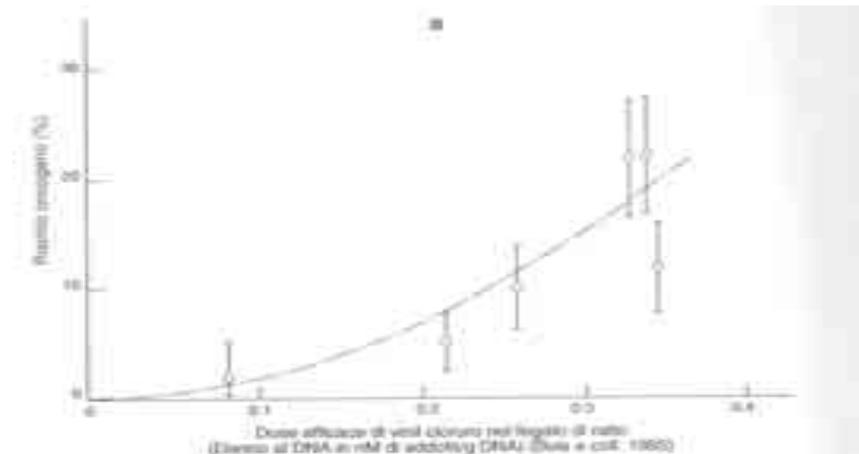
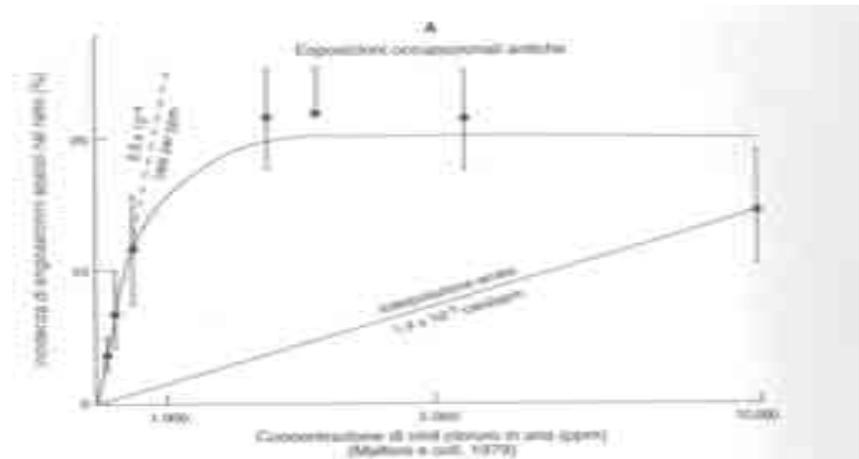


X - Estrapolazione lineare
M - Multistage
W - Weibull

L - Logit
G - gamma Multi hit
P - Probit

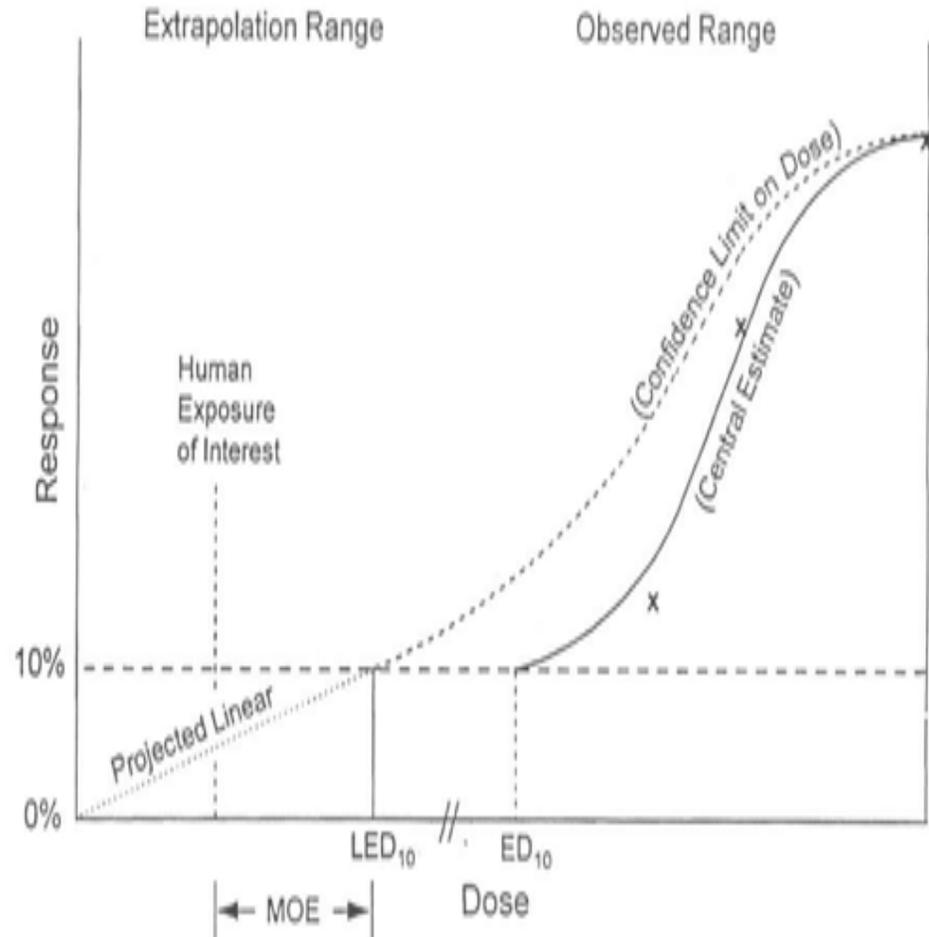
Modelli matematici utilizzati per l'estrapolazione del rischio

- Relazione dose-risposta per esposizione a vinilcloruro
 - la curva supralineare mette in relazione la dose inalata con la frequenza di angiosarcomi epatici
 - l'estrapolazione lineare è corretta solo nel tratto lineare della curva dose-effetto
- ◆ la curva della relazione dose-risposta diventa quasi lineare
- ◆ la stima di rischio ($UR = 2,5 \times 10^{-4}$), derivata da una esposizione discontinua nel ratto a 1 ppm, è coerente con quella derivata da studi epidemiologici



Stima dello slope factor

- Il risk assessment è l'uso di procedure per stimare la probabilità se una esposizione possa costituire un pericolo
- Lo slope factor misura l'incremento del rischio di insorgenza del tumore durante l'intero arco di vita associato a una determinata dose di esposizione



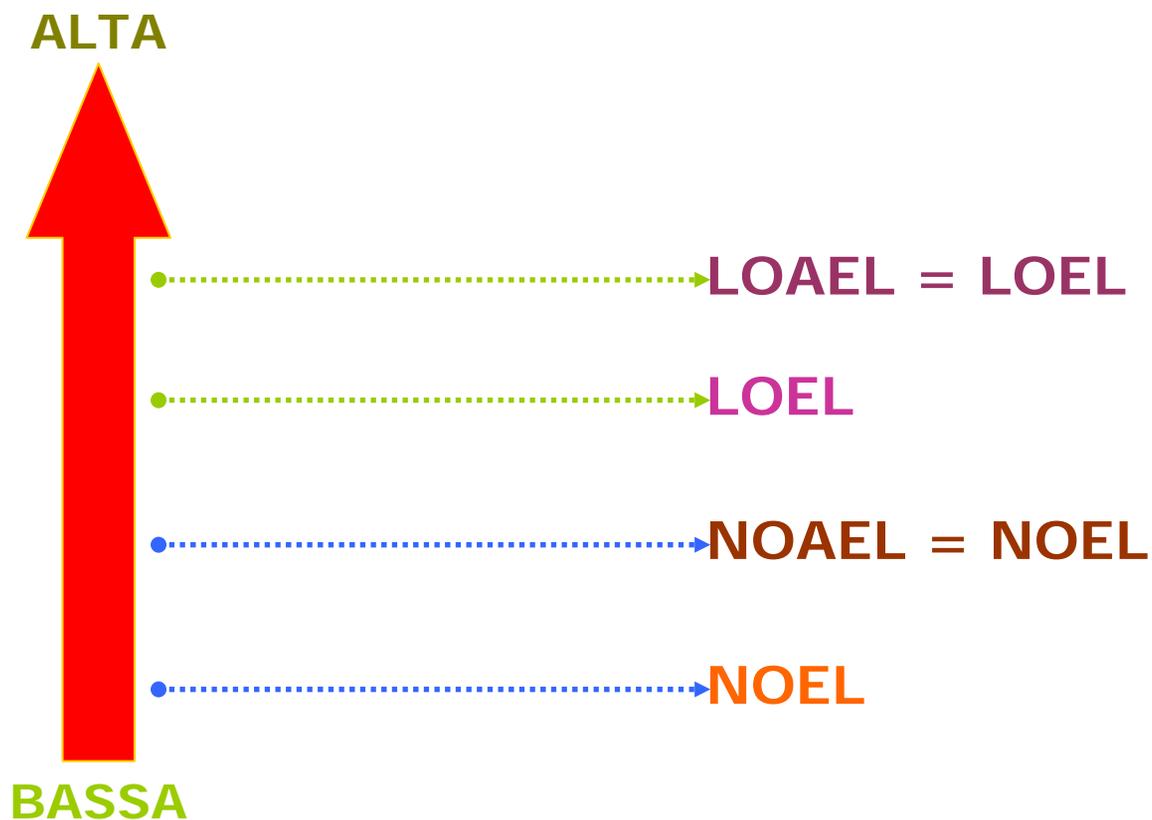
Livelli di dose accettabili

- ADI
 - acceptable daily intake (dose giornaliera accettabile)
- TDI
 - tolerable daily intake (dose giornaliera tollerabile)

ADI e TDI = NOEL / fattore di sicurezza

Livelli di dose accettabili

Dose in mg/kg p.c./giorno



Livelli di dose accettabili

- NOEL
 - no observed effect level
- NOAEL
 - no observed adverse effect level
- LOEL
 - lowest observed effect level
- LOAEL
 - lowest observed adverse effect level

Diossina e composti diossino-simili

- Tra i composti piu' tossici rilasciati nell'ambiente
- TCDD
 - Cloracne
 - Iperpigmentazione
 - Elevati livelli degli enzimi epatici
 - Incremento del rischio di diabete
 - Interferenza endocrina
 - Tumore??

Risk assessment per diossina e composti diossino-simili

- Dioxins
 - Oral route
 - **TDI (pg/kg p.c./day)** (limit value protecting from various toxic effects, cancer included)
 - 1 ITER (MCRL) (minimal chronic risk level)
 - 2 COT UK
 - 2 (1-4) WHO 1998 , WHO 2000, E.U. SCF 2000
 - 1.4
 - 2 E.U. SCF 2001
 - **UR of cancer** (excess tumors by lifetime intake of 1 pg/kg p.c./day TCDD)
 - from 2×10^{-6} to 1×10^{-3} according to various Authors
 - 1.08×10^{-5} according to California EPA 2005 , the most reliable estimate at the moment.
 - Inhalation
 - **UR of cancer** (excess tumors after lifetime inhalation of 1 pg/mc TCDD)
 - 3.8×10^{-5}

- PCB
 - Oral route
 - RfD
 - $2 - 7 \times 10^{-5}$ mg/kg p.c./day for Aroclor 1016 and Aroclor 1254
 - TDI (non planar)
 - 0.01 microg/kg p.c./day
 - UR of cancer
 - 2×10^{-3} /microg/kg p.c./day and UR 10^{-5} /microg/l (drinking water)
 - Inhalation
 - UR of cancer
 - 10^{-4} /microg/mc (central estimate of low risk and persistence) and $1.1 - 5.7 \times 10^{-4}$ /microg/mc
 - TCA (non planar)
 - 0.5 microg/mc

MRL

- livelli di rischio minimo (MRL)
 - MRL stimati sull'esposizione umana giornaliera a un composto chimico che non mostra incremento apprezzabile di rischio per effetti avversi non tumorali nel periodo di esposizione
 - Calcolati sull'endpoint piu' sensibile
 - NOAEL piu' alto
 - LOAEL piu' basso

Istituto superiore per la Ricerca e la
Protezione Ambientale



Ministero del Lavoro, Salute e
Politiche Sociali

In collaborazione con:

Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

Ministero dello Sviluppo Economico

Istituto Superiore di Sanità

Test alternativi e tecniche innovative per la predizione del rischio

Annamaria Colacci

Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente
Emilia Romagna

6. Modelli in vitro di predizione di rischio cancerogeno

Modelli predittivi di cancerogenesi

- Limiti degli studi a lungo termine nell'animale
 - Costi elevati
 - Specificità di specie e di ceppo
 - Peculiarità nelle vie di somministrazione
 - Difficoltà nell'estrapolazione all'uomo
 - Pochissimi dati su miscele complesse

Quali modelli?

In contrast to the 1986 guidelines there is no a priori focus on animal cancer bioassay

EPA's revised cancer risk guidelines, 1998

- Analisi integrata di tutta l'evidenza scientifica
 - Proprietà fisico-chimiche dei composti
 - Correlazioni struttura-attività
 - Informazioni farmacocinetiche
 - Studi meccanicistici

Regolamento (CE) 1907/2006

- Art. 40. La Commissione, gli Stati membri, l'industria e gli altri
- soggetti interessati dovrebbero continuare a contribuire
 - alla promozione, a livello internazionale e nazionale, di
 - metodi di prova alternativi, tra cui metodologie assistite
 - da computer, appropriate metodologie in vitro, metodologie
 - basate sulla tossicogenomica e altre metodologie
 - pertinenti. La strategia comunitaria di promozione di
 - metodi di prova alternativi è una priorità e la Commissione
 - dovrebbe garantire che essa rimanga tale nell'ambito
 - dei suoi futuri programmi quadro di ricerca e di
 - iniziative quali il piano d'azione comunitario per la protezione
 - e il benessere degli animali 2006-2010. Si
 - dovrebbe puntare alla partecipazione degli operatori e ad
 - iniziative che coinvolgano tutte le parti interessate.

PERCHE' GLI STUDI IN VITRO?

- Pressioni dell'opinione pubblica per la riduzione dell'uso di animali nella sperimentazione tossicologica
- Costo elevato degli studi in vivo tradizionali
- Difficile estrapolazione dei risultati ottenuti negli animali all'uomo

LE 3 R

- Ogni ricercatore che pianifichi l'uso di animali nelle proprie ricerche deve prima dimostrare perché non ci sono alternative e che cosa farà per minimizzare il numero degli animali sottoposta a sperimentazione e le loro sofferenze

LE 3 R

- REPLACE
 - SOSTITUIRE L'USO DI ANIMALI CON TECNICHE ALTERNATIVE O EVITARNE COMPLETAMENTE L'USO
- REDUCE
 - RIDURRE AL MINIMO IL NUMERO DI ANIMALI UTILIZZATI PER OTTENERE LE INFORMAZIONI DA MENO ANIMALI O PIU' INFORMAZIONI DALLO STESSO NUMERO DI ANIMALI
- REFINE
 - AFFINARE IL MODO IN CUI GLI ESPERIMENTI SONO CONDOTTI PER ESSERE CERTI CHE GLI ANIMALI SOFFRANO IL MENO POSIBILE. CIO' INCLUDE UNA MIGLIORE STABILIZZAZIONE E IL PASSAGGIO A PROCEDURE CHE MINIMIZZINO LE SOFFERENZE O AUMENTINO IL BENESSERE ANIMALE

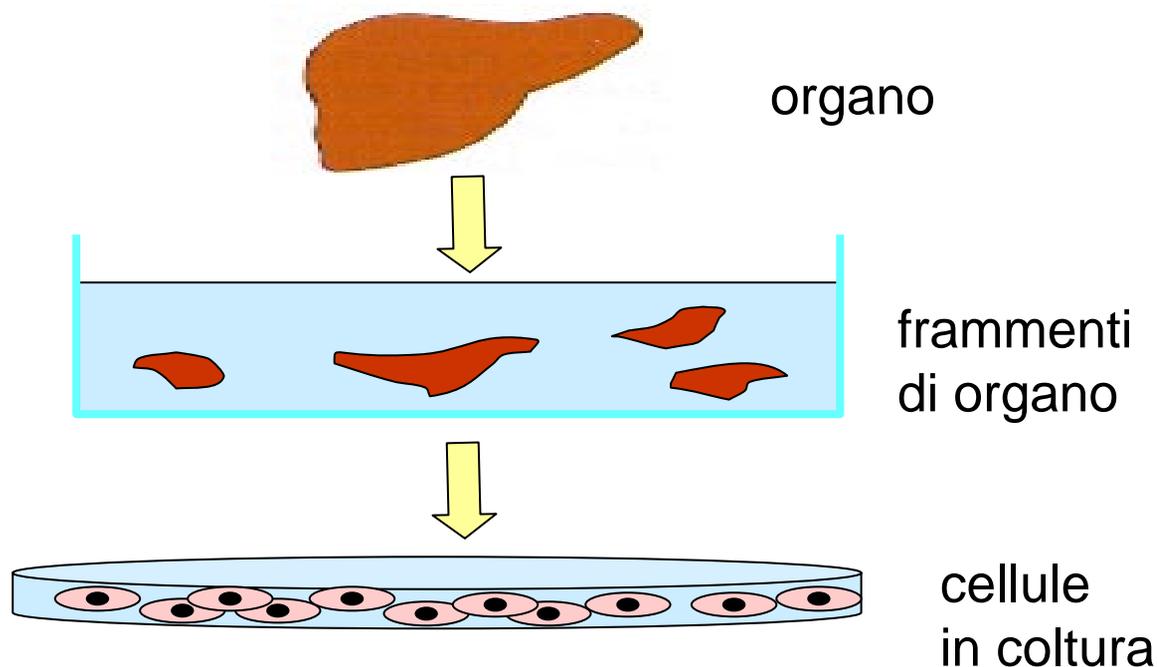
MODELLI IN VITRO

- VANTAGGI
 - RAPIDITÀ, ECONOMICITÀ, RIPRODUCIBILITÀ
 - CONTROLLO DELLE VARIABILI SPERIMENTALI
 - VALUTAZIONE DELLE RELAZIONI DOSE-RISPOSTA
 - IDENTIFICAZIONE DI PARAMETRI CRITICI PER GLI EFFETTI AVVERSI
 - STUDIO DEI MECCANISMI BIOCHIMICI E MOLECOLARI ALLA BASE DEGLI EFFETTI BIOLOGICI
 - SCREENING PRELIMINARE DI NUOVI MATERIALI

MODELLI IN VITRO

- LIMITI
 - NON SONO VALUTABILI PARAMETRI FONDAMENTALI NELLA AZIONE BIOLOGICA
 - Assorbimento
 - Distribuzione
 - Metabolismo
 - POSSIBILITÀ DI FALSI POSITIVI
 - MODELLI NON DIRETTAMENTE CORRELABILI CON L'ORGANO TARGET

COLTURE CELLULARI



Con il termine di colture cellulari si intende la tecnica di coltivazione delle cellule *in vitro*. Attualmente la procedura più comune consiste nel disgregare piccoli pezzi di tessuto e risospendere poi le cellule dissociate in un opportuno terreno nutritivo nel quale esse si accrescono e si dividono come entità separate.

COLTURE CELLULARI

- materiale di partenza per l'estrazione e la purificazione di proteine o acidi nucleici
- analisi di un particolare comportamento biologico (proliferazione, capacità di organizzare tessuti, proprietà adesive e migratorie, risposta immune)
- esecuzione test diagnostici
- rigenerazione in vitro tessuti o organi (cute, midollo emopoietico, osso etc.)

COLTURE CELLULARI

- Vantaggi
 - Controllo condizioni ambientali e plasticità dei modelli
 - Caratterizzazione ed omogeneità
 - Economicità e rapidità risposta
 - Riduzione sperimentazione in vivo
- Svantaggi
 - Perdita di funzioni organo-specifiche, alcune attività enzimatiche, rigido controllo numero e struttura cromosomi
 - Alterazione del ciclo cellulare
 - Alterazioni morfologiche e proprietà antigeniche

COLTURE CELLULARI

- Le colture cellulari si applicano sia a cellule che vivono adese ad un substrato che a cellule che crescono in sospensione
- Le colture si realizzano a partire da sospensioni di cellule dissociate da tessuti
- Questa disgregazione permette la purificazione dei singoli tipi cellulari dalla miscela normalmente presente nei tessuti

COLTURE CELLULARI

- Linee stabilizzate
 - popolazioni omogenee di cellule in coltura “immortalizzate”
 - crescita rapida
 - Numero di divisioni in coltura indefinito
- Cellule altamente differenziate
 - Colture primarie
 - Linee cellulari specializzate

COLTURE CELLULARI

- COLTURE PRIMARIE
 - costituite da cellule che provengono direttamente dai tessuti prelevati dagli animali
- COLTURE SECONDARIE
 - sono costituite da cellule che provengono da una coltura primaria e che si sono divise in vitro o sono state propagate in vitro

COLTURE CELLULARI: GLOSSARIO

- Inibizione da contatto
 - le cellule cessano di proliferare quando entrano in contatto le une con le altre
- Monostrato
 - singolo strato di cellule che cresce su una superficie
- Densità
 - N° di cellule per unità di superficie o di volume
- Confluenza
 - Viene raggiunta quando le cellule ricoprono la superficie di crescita (100%)

COLTURE PRIMARIE

IMMORTALIZZAZIONE

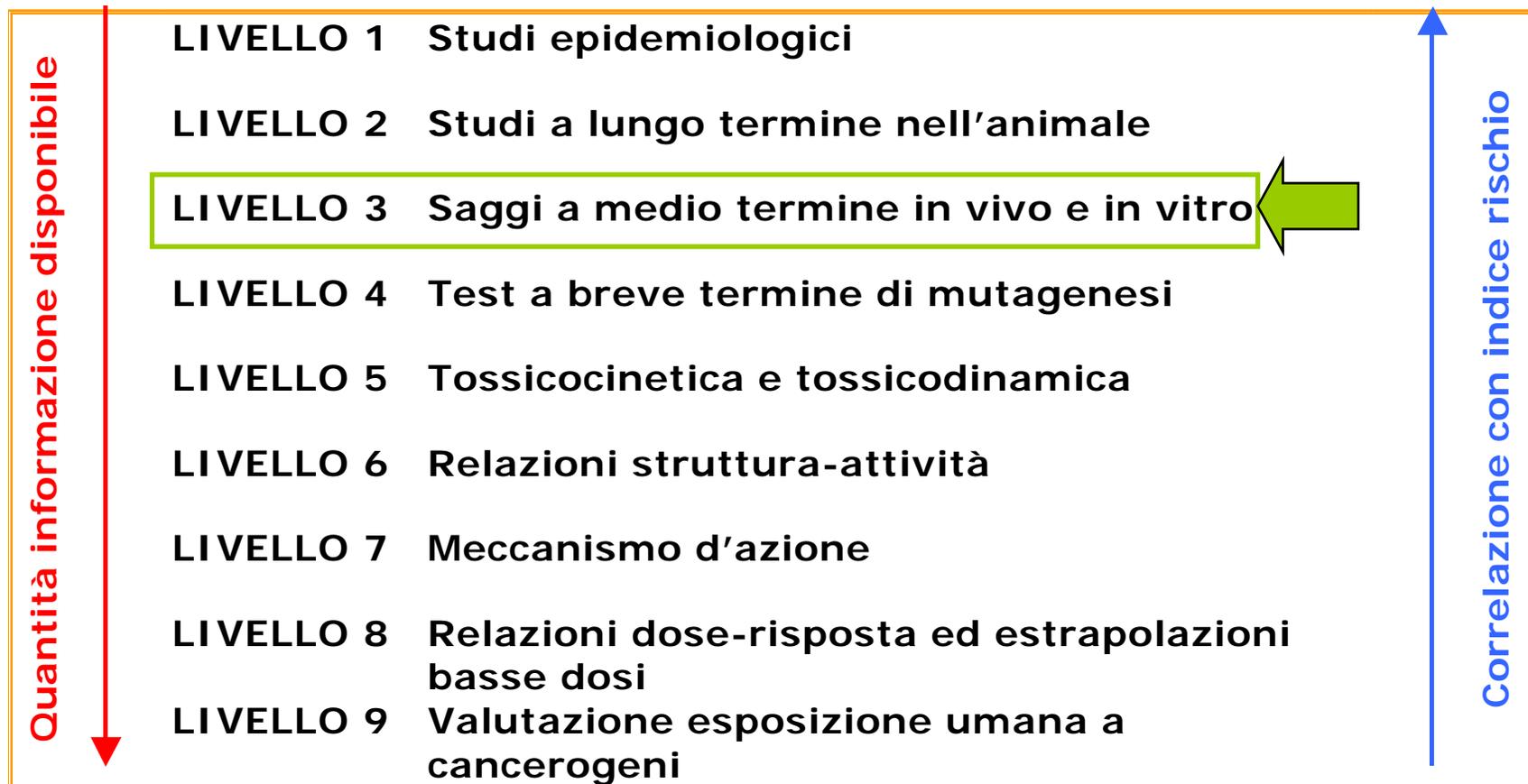
**PERDITA DI FUNZIONI ORGANO-SPECIFICHE E
DI ALCUNE ATTIVITA' ENZIMATICHE**

**PERDITA DEL CONTROLLO DEL NUMERO E DELLA
STRUTTURA DEI CROMOSOMI**

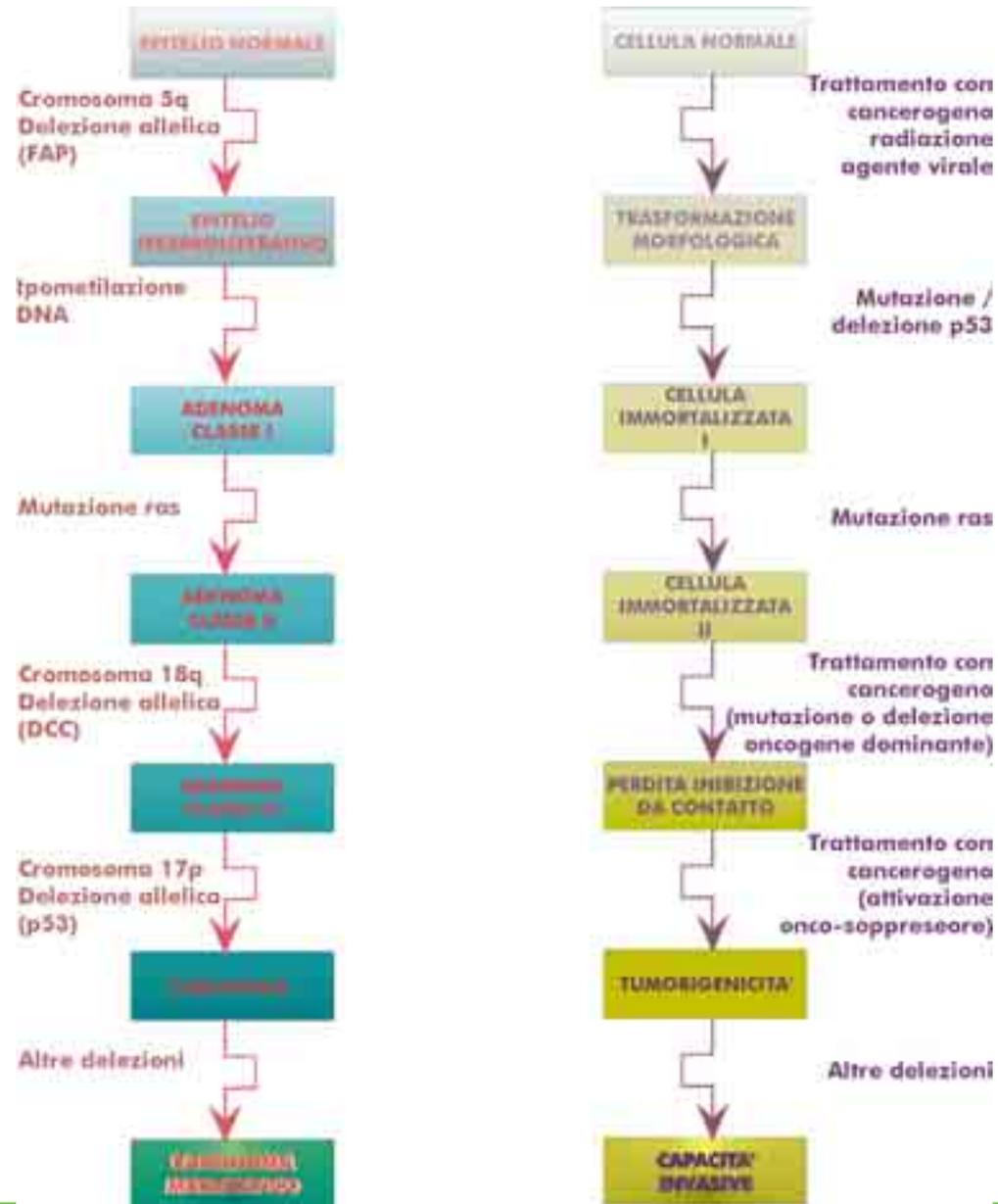
PERDITA DEL CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE

**ALTERAZIONI DELLA MORFOLOGIA E DELLE
PROPRIETA' ANTIGENICHE**

LINEE CELLULARI STABILIZZATE



Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



TRASFORMAZIONE CELLULARE

- screening test di secondo livello per cancerogenesi
- screening test per cancerogeni non genotossici
- sostituzione di test in vitro di mutagenesi con attività predittiva simile o inferiore

TRASFORMAZIONE CELLULARE

Annex V to Directive 67/548/EEC

Part B: Methods for the determination of toxicity

B. 21. *IN VITRO* MAMMALIAN CELL TRANSFORMATION TESTS

1. METHOD

1.1. Introduction

See General Introduction Part B.

1.2. Definition

See General Introduction Part B.

1.3. Reference substances

None.

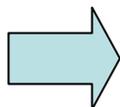
1.4. Principle of the test method

Mammalian cell culture systems may be used to detect phenotypic changes *in vitro* induced by chemical substances associated with malignant transformation *in vivo*. Widely used cells include C3H10T_{1/2}, 3T3, SHE, Fischer rat and the tests rely on changes in cell morphology, focus formation or changes in anchorage dependence in semi-solid agar. Less widely used systems exist which detect other physiological or morphological changes in cells following exposure to carcinogenic chemicals. None of the *in vitro* test endpoints has an established mechanistic link with cancer. Some of the test systems are capable of detecting tumour promoters. Cytotoxicity may be determined by measuring the effect of the test material on colony-forming abilities (cloning efficiency) or growth rates of the cultures. The measurement of cytotoxicity is to establish that exposure to the test chemical has been toxicologically relevant but cannot be used to calculate transformation: frequency in all assays since some may involve prolonged incubation and/or replating.

1.5. Quality criteria

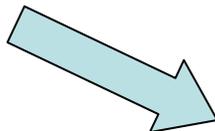
MODELLI IN VITRO DI TRASFORMAZIONE CELLULARE

SHE



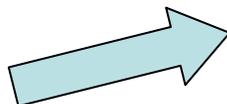
cellule con cariotipo normale
effetti su fasi precoci della
cancerogenesi

BALB/c 3T3



cellule immortalizzate
aneuploidi

C3H10T1/2



effetti su fasi più tardive
della cancerogenesi

Test di trasformazione in vitro

- Syrian Hamster Embryo Cells
- C3H10T1/2
- BALB/c 3T3

Il modello BALB/c 3T3

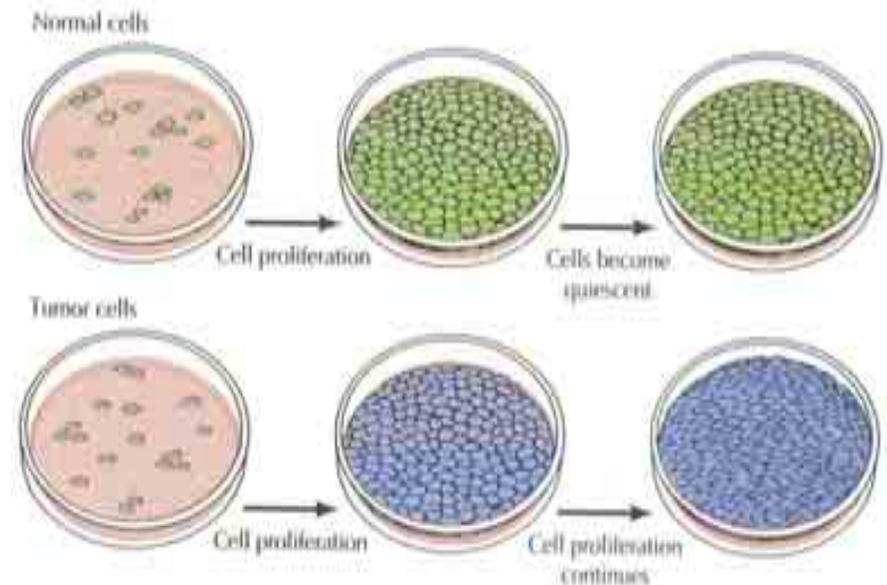
- Il modello:
 - Descrive la tossicità della miscela
 - Analizza la potenzialità cancerogena
 - Individua relazioni dose-risposta
 - Adatto allo studio di miscele complesse ambientali

Il modello BALB/c 3T3

- I fibroblasti murini BALB/c 3T3 crescono in un monostrato ordinato sensibile alla densità (inibizione da contatto)
- Il trattamento con cancerogeni (singoli composti o miscele complesse) determina l'insorgenza di cloni di cellule trasformate (foci) che crescono disordinatamente in pluristrato

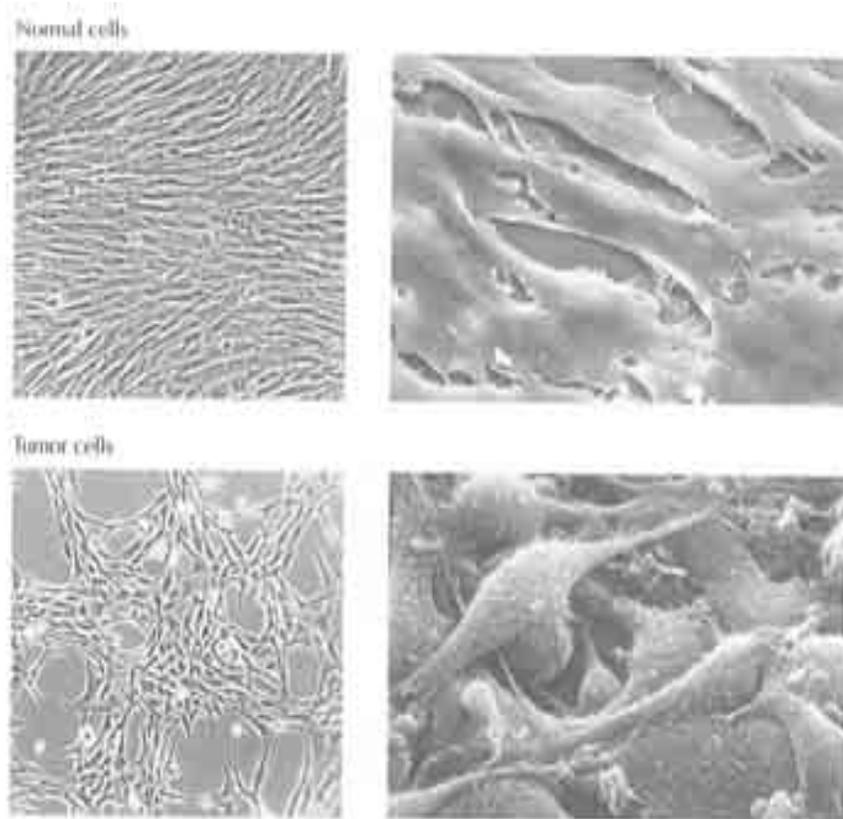
Inibizione da contatto

- Le cellule normali proliferano in coltura finché raggiungono la confluenza. A questo punto le cellule diventano quiescenti
- Le cellule tumorali, al contrario, continuano a proliferare indipendentemente dalla densità



Inibizione da contatto

- La migrazione di fibroblasti normali è inibita dal contatto fra le cellule così che essi formano un monostrato orientato ordinatamente sulla superficie della piastra di coltura
- Le cellule tumorali non risentono dell'inibizione da contatto, migrano l'una sull'altra e crescono disordinatamente in pluristrato



Il modello BALB/c 3T3

- Il modello:
 - Descrive la tossicità della miscela
 - Analizza la potenzialità cancerogena
 - Individua relazioni dose-risposta
 - Adatto allo studio di miscele complesse ambientali

MODELLI IN VITRO DI TRASFORMAZIONE CELLULARE

**OECD Environment, Health and Safety Publications
Series on Testing and Assessment
No. 31**

**DETAILED REVIEW PAPER ON CELL TRANSFORMATION ASSAYS FOR
DETECTION OF CHEMICAL CARCINOGENS**

Environment Directorate

Organisation for Economic Co-operation and Development

**November 28, 2006
(Draft 4th version)**

MODELLO BALB/c 3T3

- IL DATA SET DEI RISULTATI OTTENUTI IN BALB/C 3T3 SU 186 COMPOSTI CHIMICI COMPRENDE
 - 165 COMPOSTI ORGANICI
 - 112 CLASSIFICATI COME CANCEROGENI NEI RODITORI
 - 53 CLASSIFICATI COME NON CANCEROGENI NEI RODITORI
 - 21 COMPOSTI INORGANICI
 - 15 CLASSIFICATI COME CANCEROGENI NEI RODITORI
 - 6 CLASSIFICATI COME NON CANCEROGENI NEI RODITORI

VALUTAZIONE DEI MODELLI SPERIMENTALI IN VITRO

		<i>In vivo</i> Carcinogenicity	
		Carcinogen	Non-carcinogen
Cell Transformation Assay	+	a	b
	-	c	d

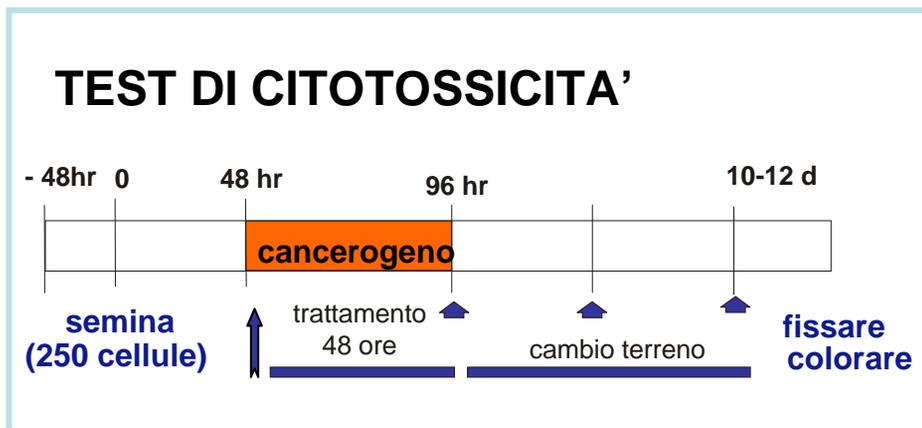
- **CONCORDANCE** = % agreement with in vivo experiment
 - $(a + d) / (a + b + c + d) * 100$
- **SENSITIVITY**: % carcinogens that are positive
 - $a / (a + c) * 100$
- **SPECIFICITY**: % non-carcinogens that are negative
 - $d / (b + d) * 100$
- **POSITIVE PREDICTIVITY**: % positives that are carcinogens
 - $a / (a + b) * 100$
- **NEGATIVE PREDICTIVITY**: % negatives that are non-carcinogens
 - $d / (c + d) * 100$
- **FALSE NEGATIVES**:
 - $c / (a + c) * 100$
- **FALSE POSITIVES**:
 - $b / (b + d) * 100$

7. Implementazione del modello per migliorare la sensibilità e la specificità del test

MODELLO BALB/c 3T3

- Esperienza Internazionale
 - Utilizzato per lo screening di cancerogeni e di promoveni (cancerogeni non mutageni con dose soglia stimabile)
 - Concordanza con il test nell'animale (IARC/NCI/EPA Working Group 1989, 1993, OECD Working Group 2006)
 - Il protocollo sperimentale è attualmente sottoposto a uno studio di pre-validazione coordinato dall'ECVAM, che dovrebbe terminare nella primavera 2007
- La nostra esperienza (dal 1989)
 - composti singoli
 - Solventi
 - Pesticidi
 - Farmaci
 - Biotossine algali
 - miscele complesse
 - Contaminanti in matrici ambientali (suolo, acqua, fanghi, aria)
 - Miscele complesse da immettere nell'ambiente (carburanti)

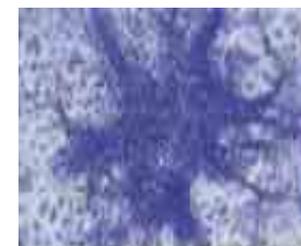
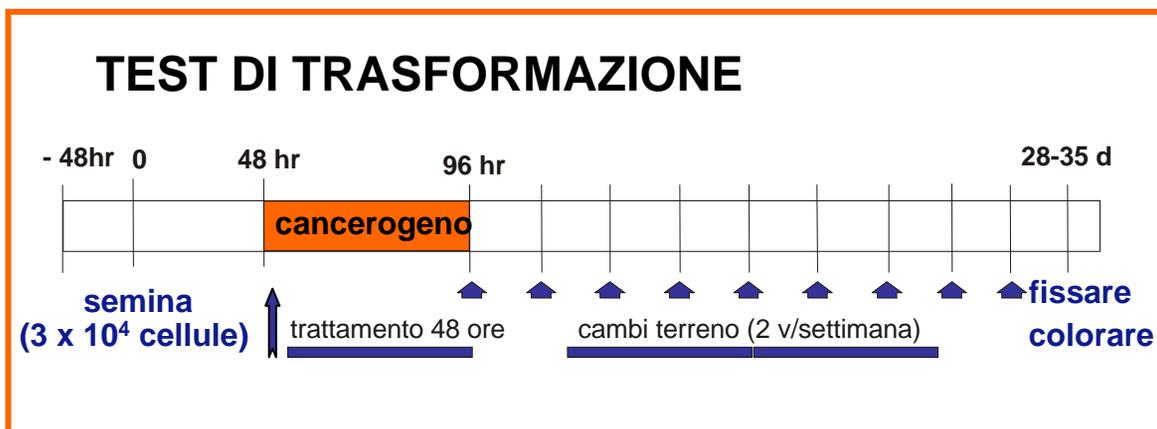
MODELLO BALB/c 3T3



END POINT



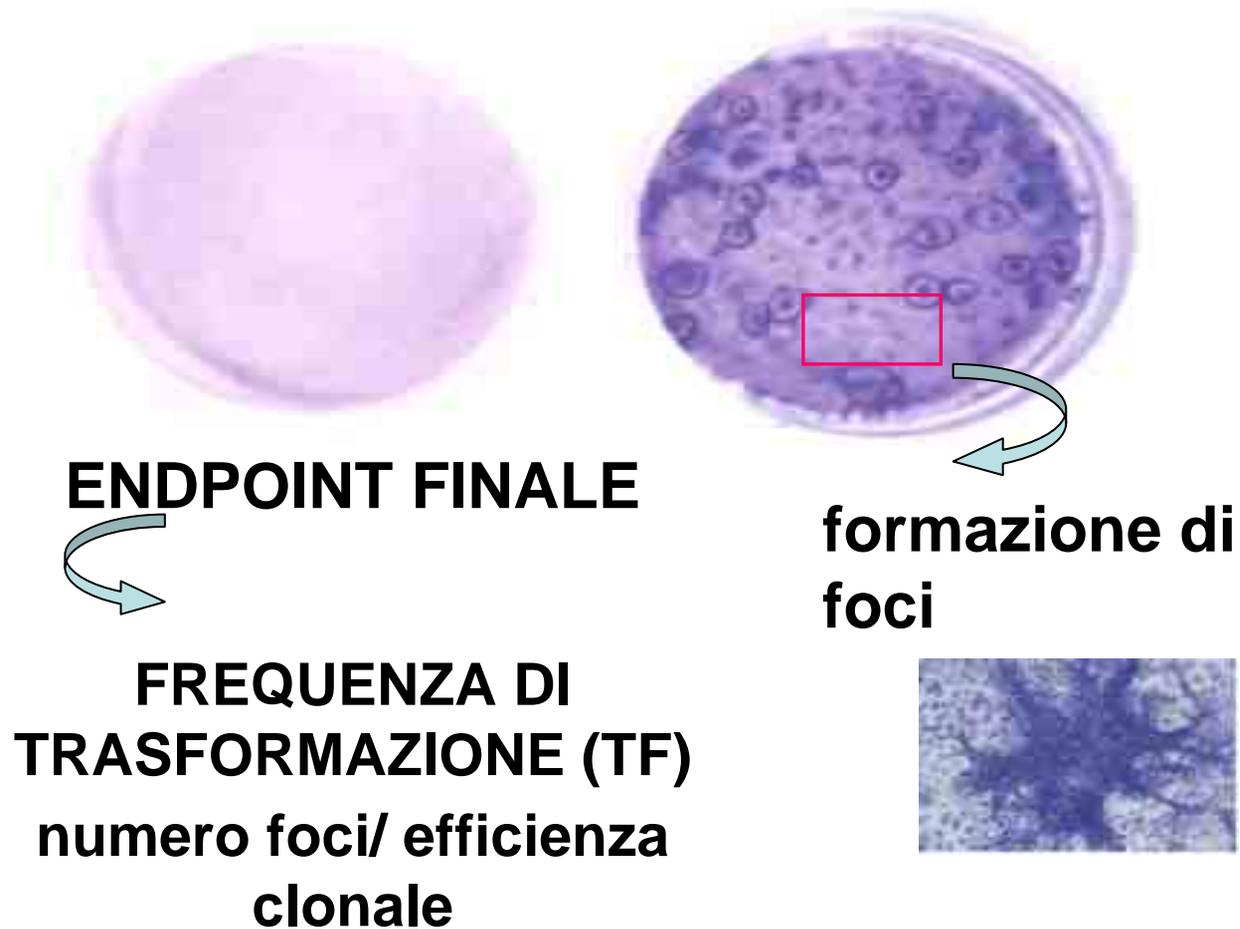
efficienza clonale



END POINT

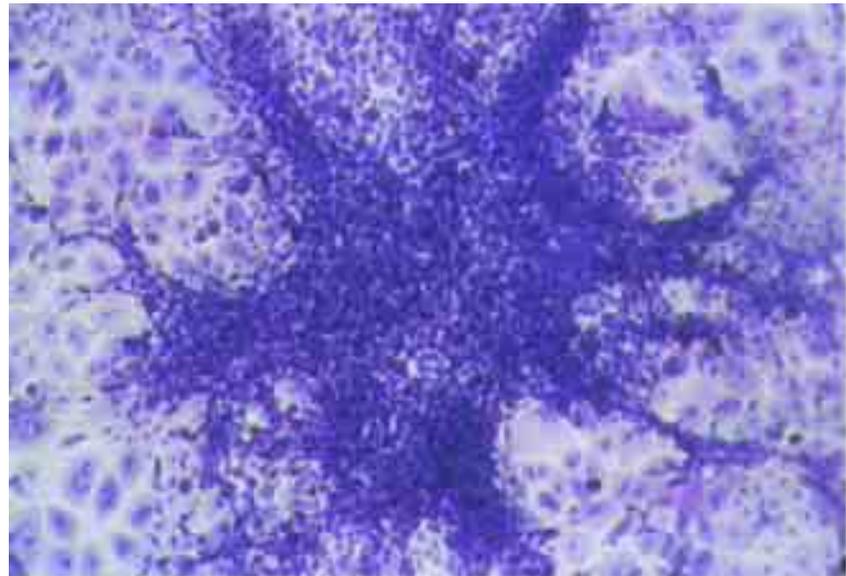
frequenza di trasformazione

MODELLO BALB/c 3T3



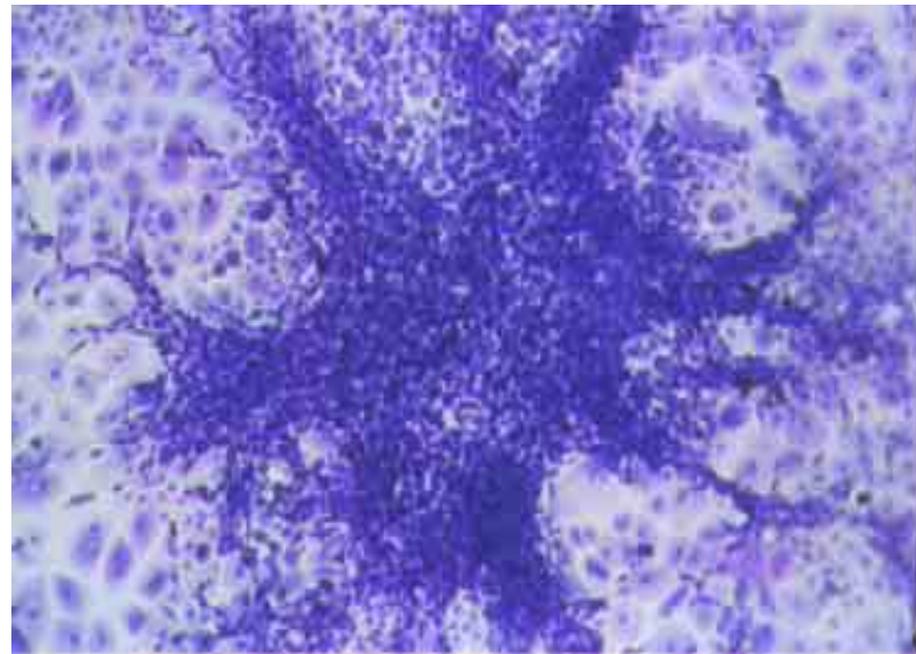
Il modello BALB/c 3T3

- Il test di trasformazione cellulare misura un endpoint facilmente individuabile rappresentato dal focus trasformato
- Il numero dei foci maligni è direttamente correlato con la dose



Il modello di trasformazione cellulare

- Caratteristiche di un focus maligno (tipo III) nel modello BALB/c 3T3
 - Forte basofilia
 - Densa sovrapposizione di cellule
 - Orientamento casuale delle cellule alla periferia del focus
 - Cellule fusiformi (spindle-shaped)
 - Formazione di criss-cross alla periferia del focus
 - Infiltrazione del focus ramificato nel monostrato adiacente

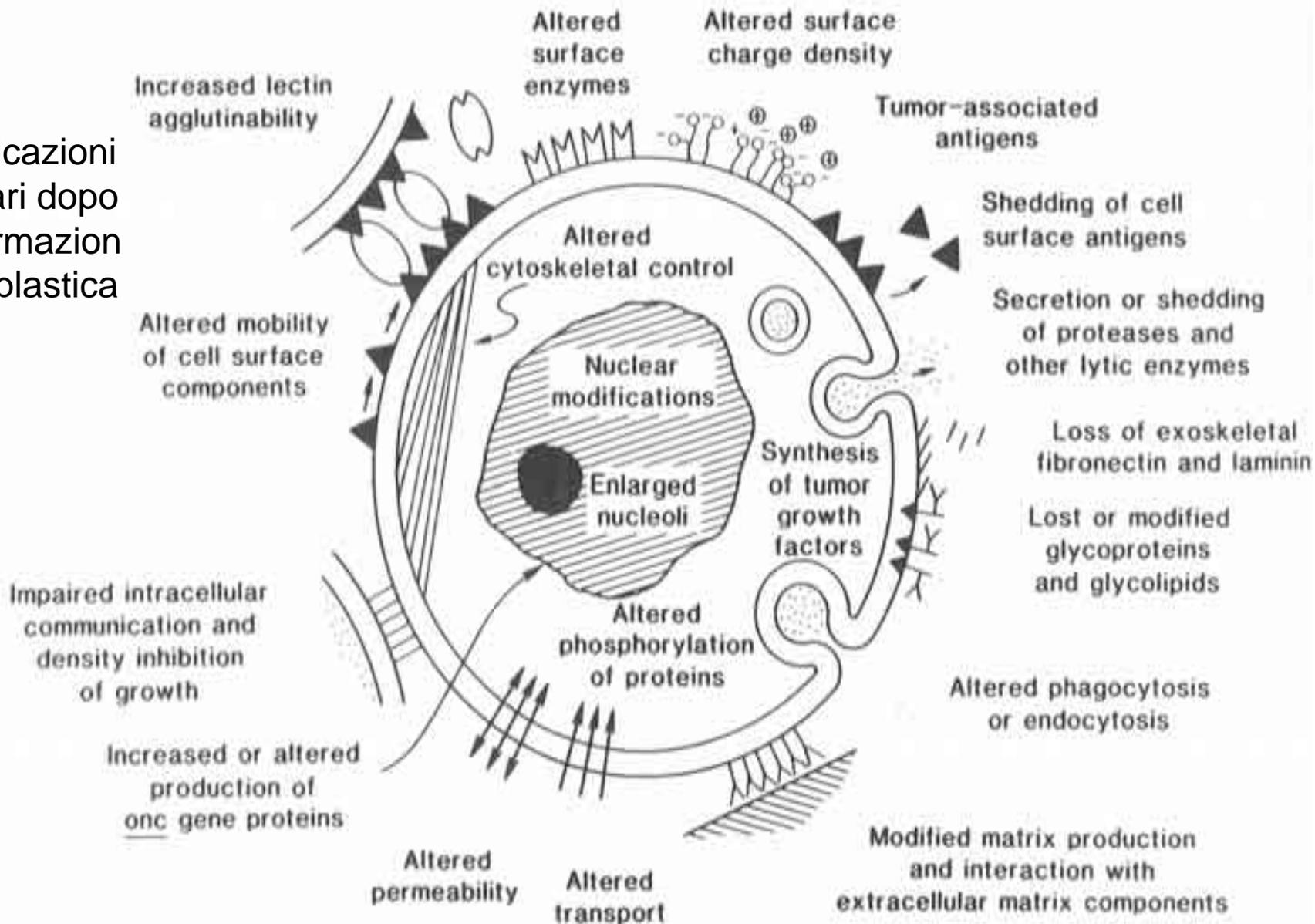


Test in vitro a medio termine

- Il Modello BALB/C 3T3:
 - Uno modello in grado di verificare le capacità trasformanti di composti singoli e miscele complesse e di predire la potenza cancerogena
 - Comprende differenti test che consentono di descrivere il ruolo e il peso della miscela in esame nel processo di cancerogenesi
 - Test di citotossicità
 - Test di trasformazione in cellule BALB/c 3T3
 - Test di trasformazione in 2 fasi: iniziazione/promozione
 - Test delle comunicazioni intercellulari GJIC
 - Valutazione dell'impatto di promoveni sulla interazione cellula-cellula
 - Test di chemiotassi/chemioinvasione
 - Valutazione delle tappe tardive della cancerogenesi multifasica
 - Test di apoptosi

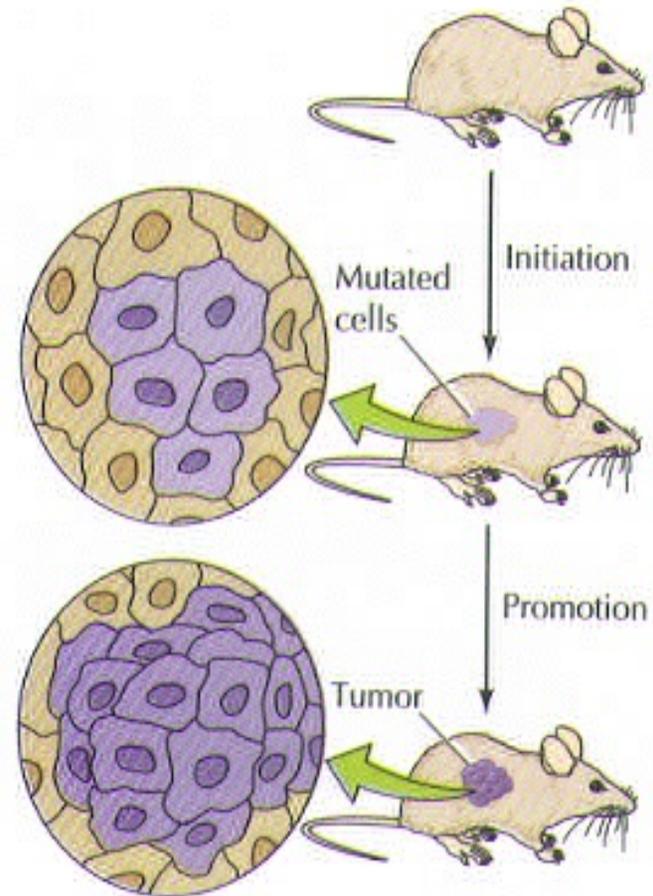
Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH

modificazioni cellulari dopo trasformazione e neoplastica



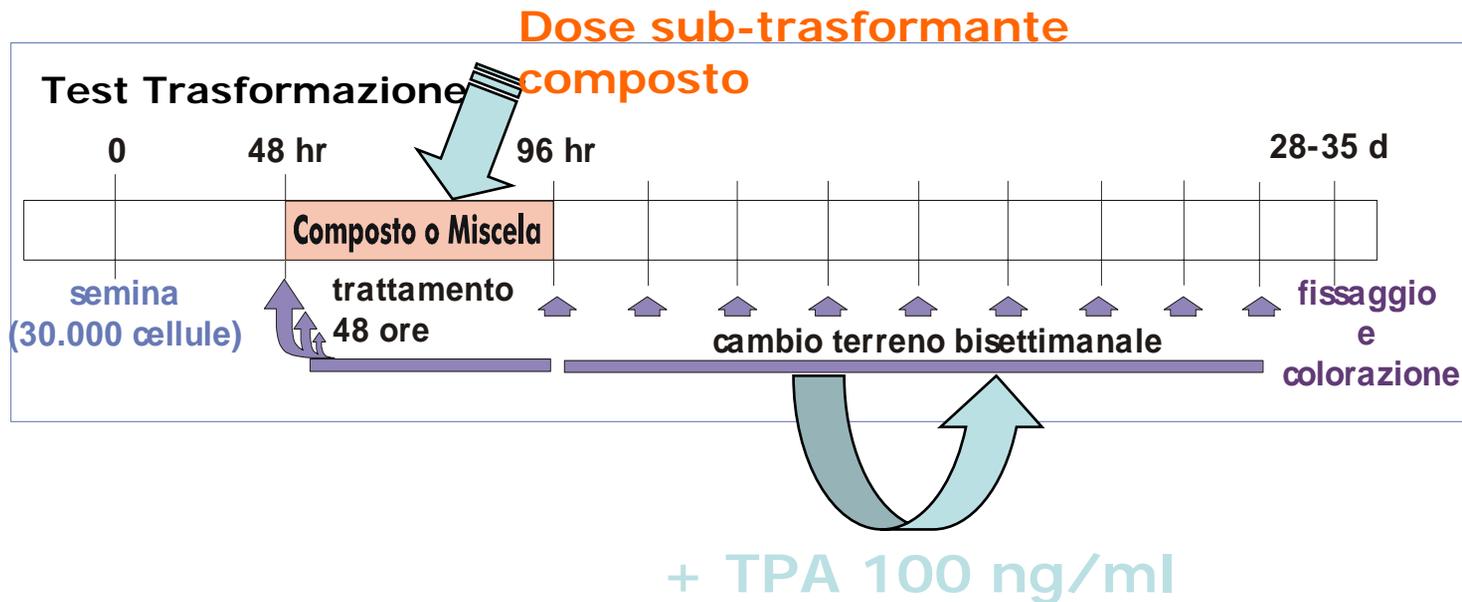
Induzione di tumore nella cute del topo

- I tumori sono iniziati da mutazioni indotte da un cancerogeno
- Lo sviluppo del tumore richiede il trattamento con promozventi che stimolano la proliferazione delle cellule mutate



Test ininizzazione/promozione nel modello BALB/c 3T3

Protocollo



Il modello BALB/c 3T3

Tossicità
Relazioni dose-risposta

Possibili effetti cancerogeni
Correlazioni dose risposta

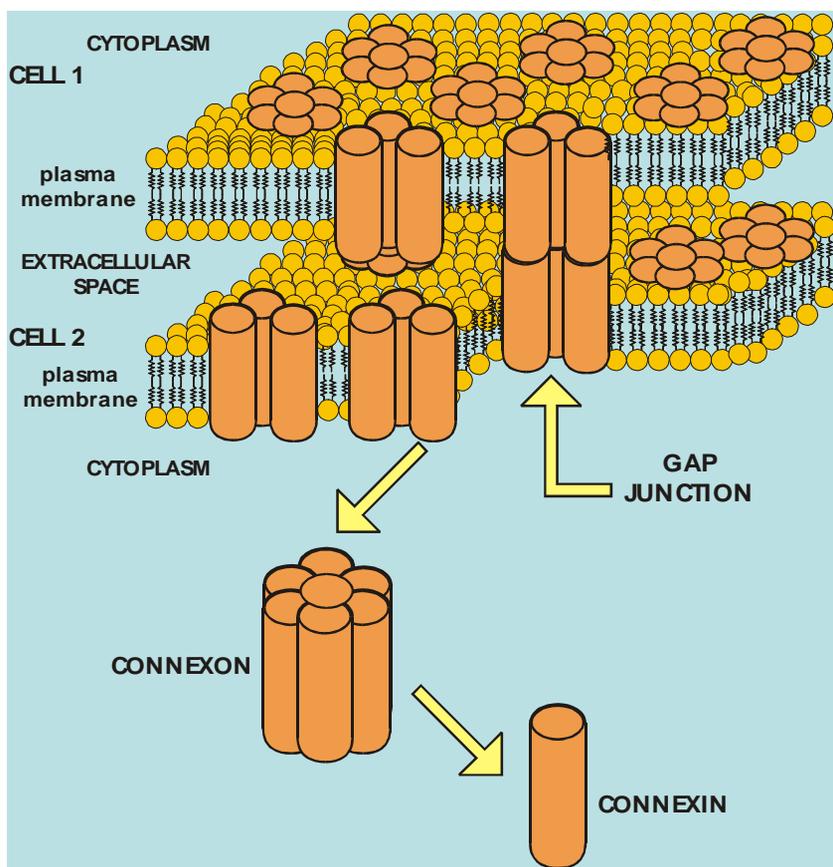
Valutazione del
Potenziale Cancerogeno

Possibili effetti iniziati
Correlazioni dose risposta

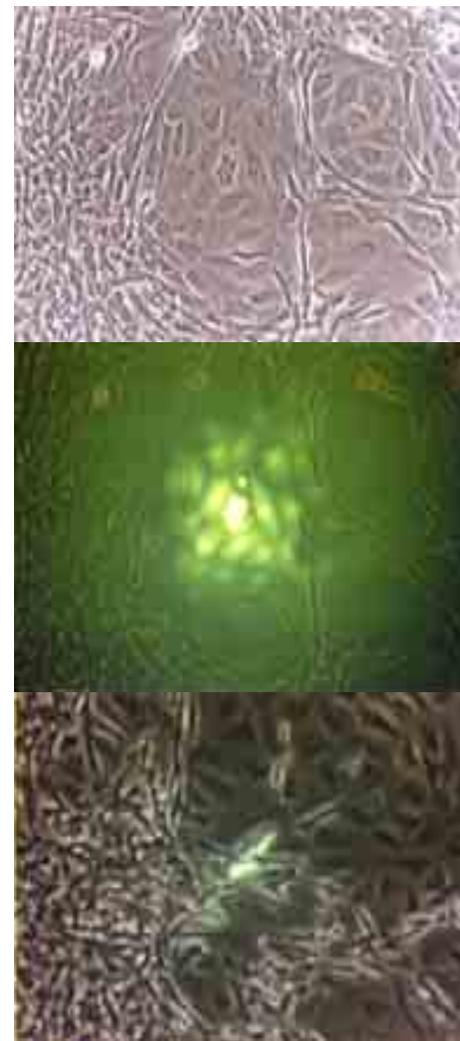
Possibili effetti promoventi
Correlazioni dose risposta

risk characterization

Il modello BALB/c 3T3: Modulazione della comunicazione intercellulare mediata da gap junctions (GJIC)



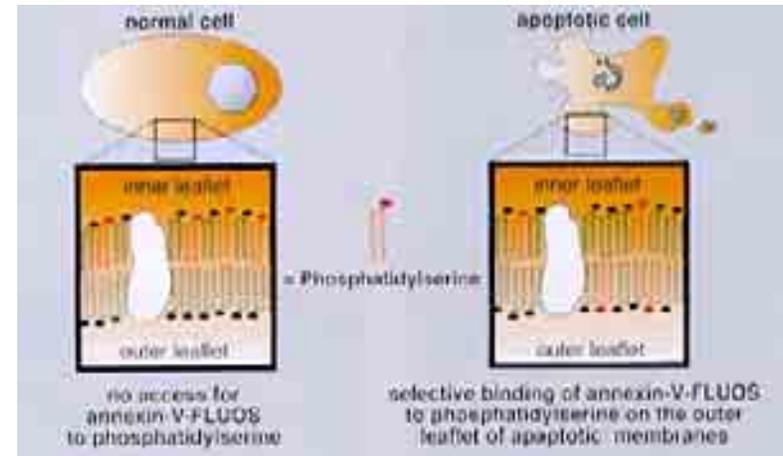
Possibile endpoint per lo screening delle sostanze chimiche promotrici
I canali GJ consentono il flusso diretto di piccole molecole tra cellule adiacenti, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi cellulare



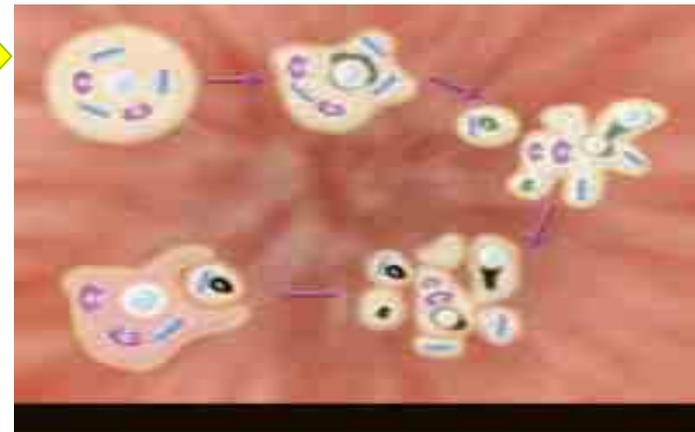
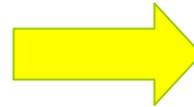
Il modello BALB/c 3T3:

Morte cellulare programmata (apoptosi): un endpoint per descrivere l'attività tossicologica delle miscele ambientali

- **Eventi precoci:**
traslocazione di fosfatidilserina



- **Eventi tardivi:**
condensazione e frammentazione della cromatina



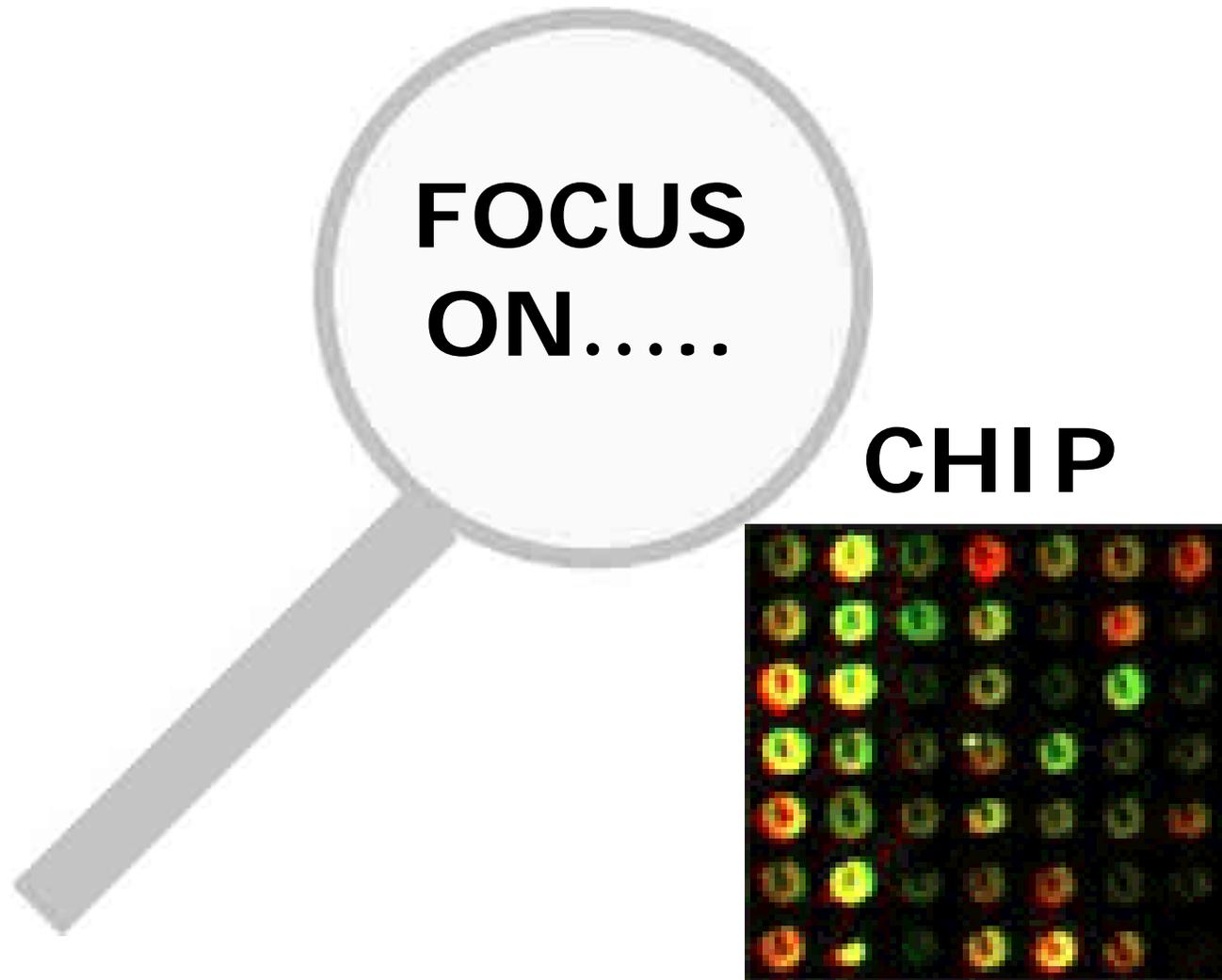
Correlazioni tra effetto cancerogeno e proprietà genotossiche

	Genotossicità			
	Sufficiente		Limitata	
	No.	%	No.	%
1	24/30	80	28/30	93
2A	14/20	70	18/20	90
2B	72/128	56	117/128	91
3	19/66	29	59/66	90

Correlazioni tra effetto cancerogeno e proprietà genotossiche

- Una combinazione del test in Salmonella con alcuni saggi in vitro in colture cellulari costituisce un sensibile strumento predittivo per identificare i cancerogeni del Gruppo 1, 2A e 2B
- La maggior parte dei composti con attività genotossica si riscontrano nel Gruppo 1 (80%)
- I composti cancerogeni per l'uomo, organici, non ormonali inducono aberrazioni nelle cellule di midollo osseo e, con eccezione del benzene, mutazioni in Salmonella

La tossicogenomica per la valutazione del rischio



Tossicologia e Tossicogenomica

- Tossicologia
 - Disciplina scientifica che si occupa dell'identificazione e comprensione dei meccanismi d'azione di agenti che attentano alla salute dell'uomo, di altri animali e dell'ambiente
- Tossicogenomica
 - Disciplina scientifica che studia le interazioni tra gli agenti ambientali e il genoma degli esseri viventi e identifica marcatori specifici di esposizione e rischio

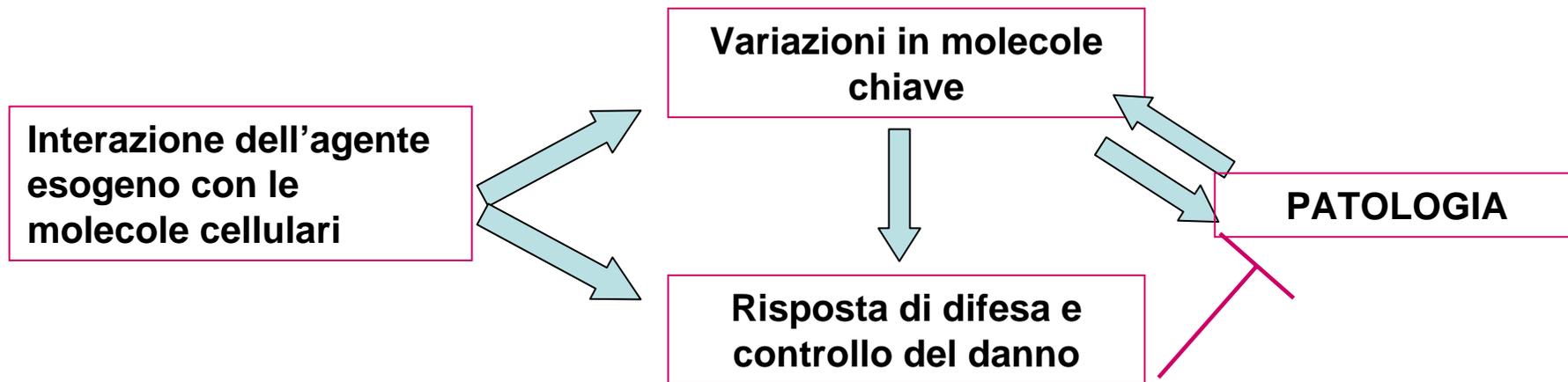
Le tappe della genetica molecolare

- 1944 Avery et al. J Exp. Med 79: 137-158
 - Funzione del DNA
- 1953 Watson & Crick Nature 171: 737-738
 - Struttura molecolare del DNA
- 1963 Speyer et al.
 - Codice genetico
- 1975 Cohen Sci. Am. 233 25-33
 - Ingegnerizzazione delle cellule
- 1999 Brown et al Nat. Gen. 21 Suppl.1
 - La tecnologia microarray
- 2001 Venter et al. Science 291: 1304-1351
 - Decodificazione del genoma

Dal particolare al globale: l'era degli "omics"

- Genetica
- Tossicologia
- Farmacologia
- Scienza della Nutrizione
- Genomica
- Tossicogenomica
- Farmacogenomica
- Nutrigenomica

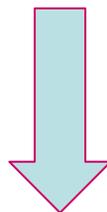
La basi della tossicogenomica



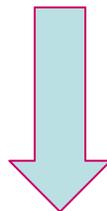
L'ERA DEGLI “omics”

- Le tecnologie biomiche
 - Genomica
 - Analizza le modificazioni lungo il genoma
 - polimorfismi
 - Genomica funzionale o Trascrittomica
 - Utilizza l'RNA per comprendere le modificazioni trascrizionali dei geni
 - Livello di espressione genica
 - Proteomica
 - Analizza le modificazioni globali delle proteine cellulari
 - proteoma
 - Metabonomica o metabolomica
 - Analizza le modificazioni dei metaboliti

**Alterazione in
gene/proteina/metabolita
chiave**



FINGERPRINT



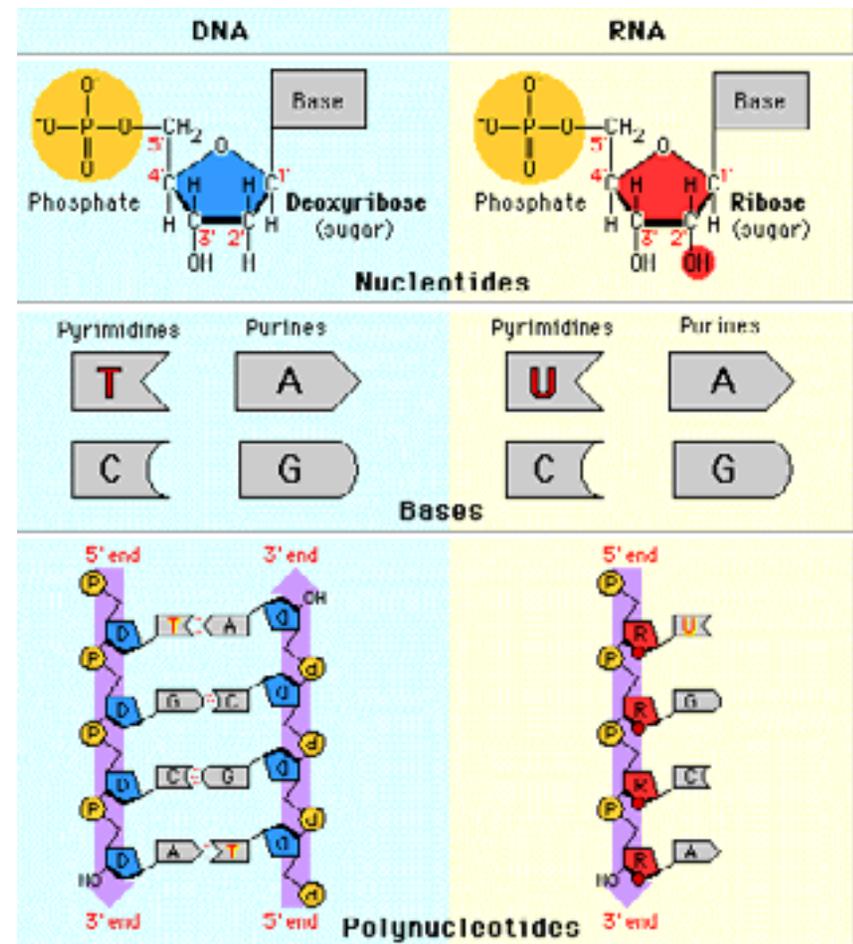
PREDIZIONE TOSSICITA'

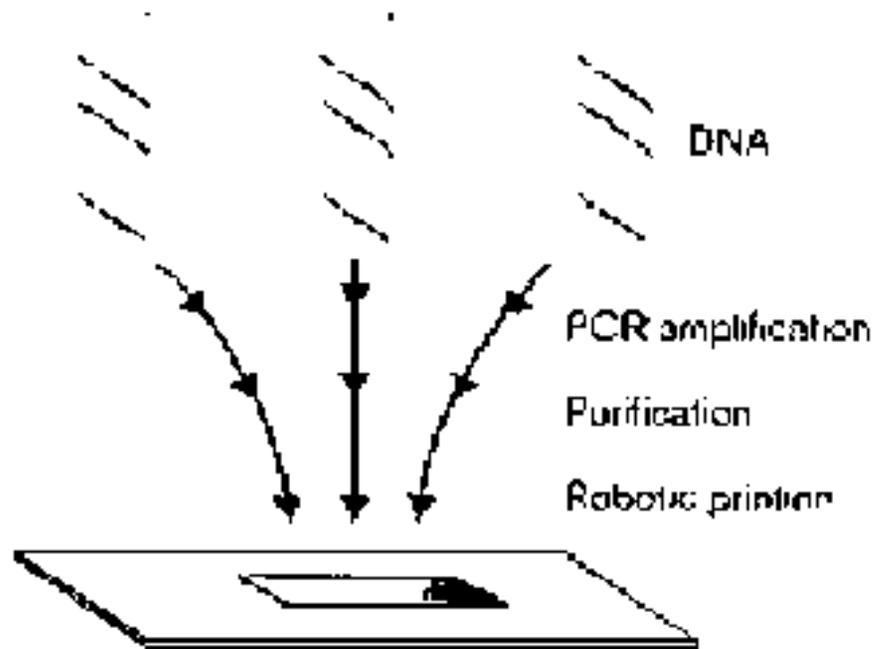
Genomica funzionale: la Tecnologia Microarray

- Profili globali di espressione genica senza limitazione ad un singolo end-point
- Possibilità di analizzare fenomeni biologici complessi
- Approccio funzionale innovativo che consente di aumentare i campi di indagine e il numero di informazioni ottenibili

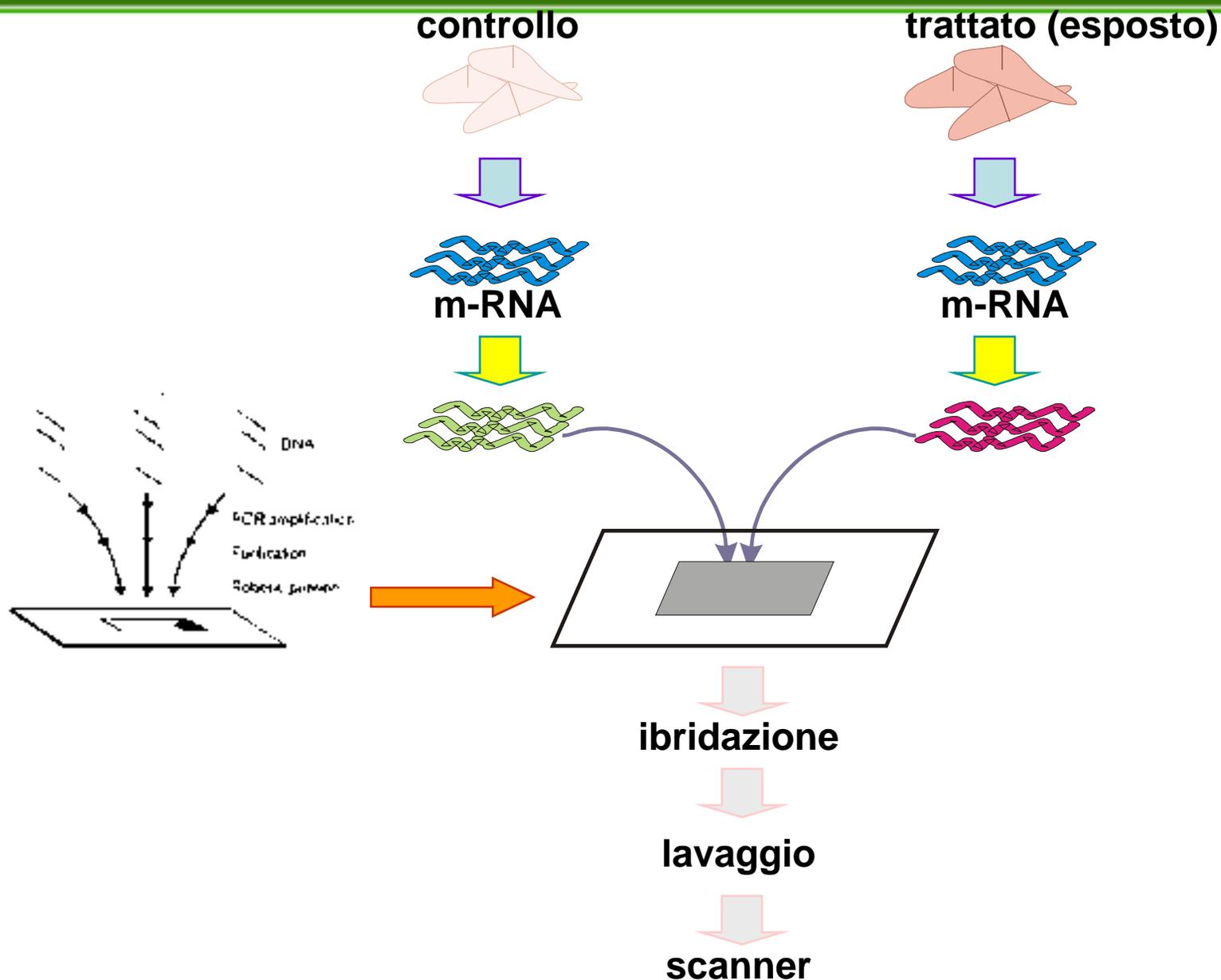
Microarray: il principio

- capacità che ogni acido nucleico a singolo filamento ha di appaiarsi alla sequenza complementare, rispettando le regole di base A-T C-G.





Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH



Microarray, aspetti della sperimentazione

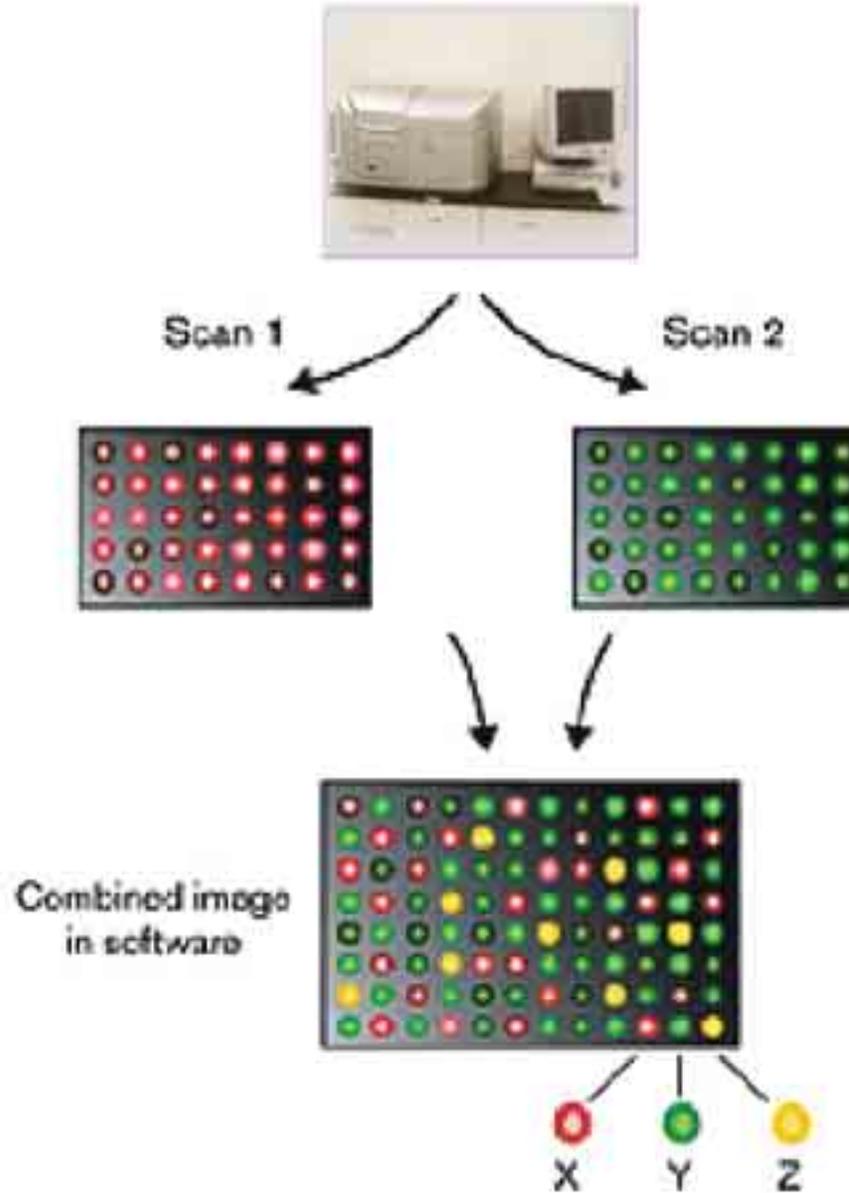
- Definizione degli obiettivi sperimentali
- Studio del disegno sperimentale e della dimensione del campione
- Familiarita' con le procedure sperimentali
- Analisi statistica dei dati
- Interpretazione biologica dei dati

Piattaforma Agilent

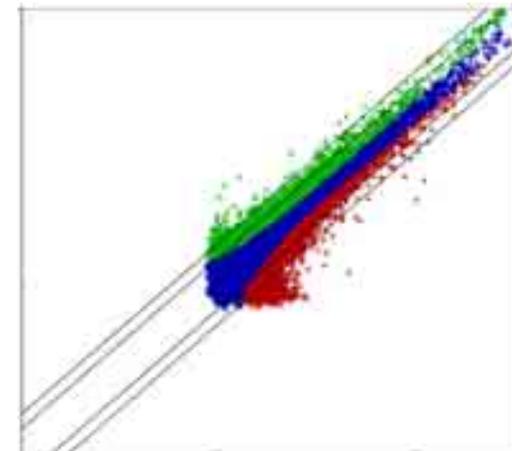
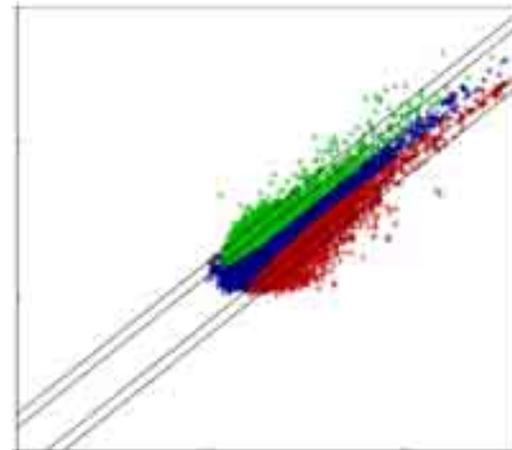
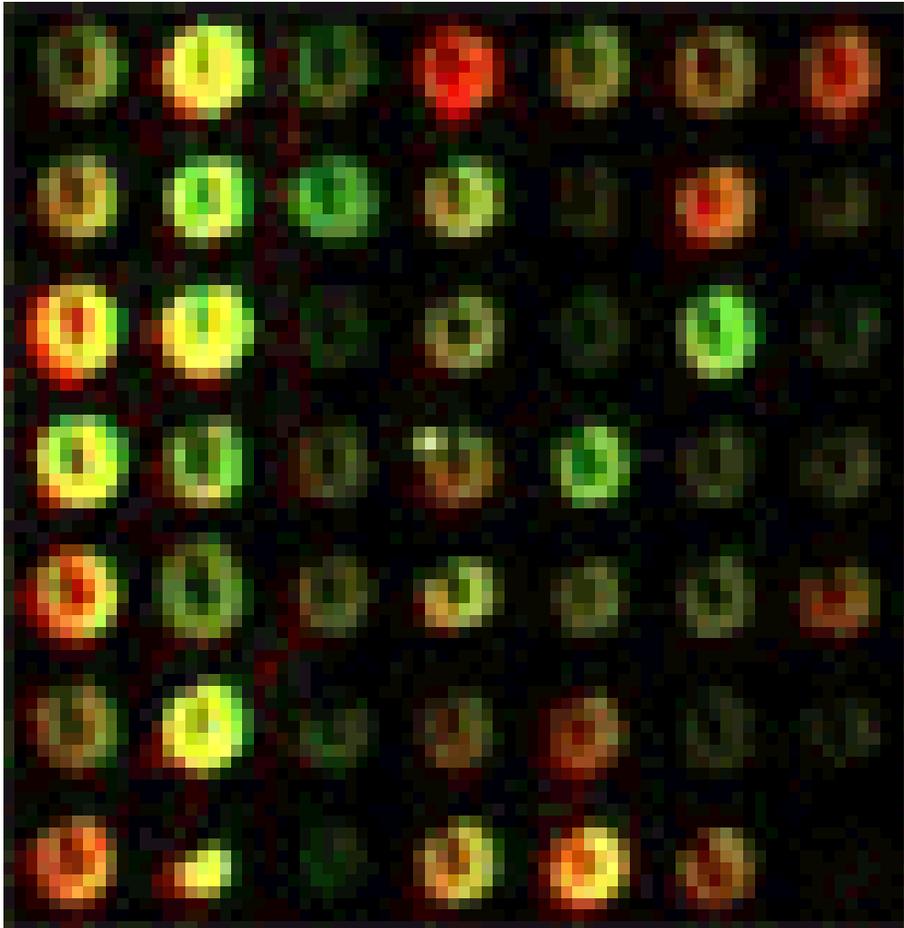
- Un laser SHG-YAG (532nm) e un laser a Elio-neon (633nm), per eccitare i fluorocromi Cy3 e Cy5.
- Carosello a 48 posizioni
- Sistema distintivo di continua messa a fuoco automatica dei laser sul piano esatto del campione durante la scansione
- Software di Feature Extraction

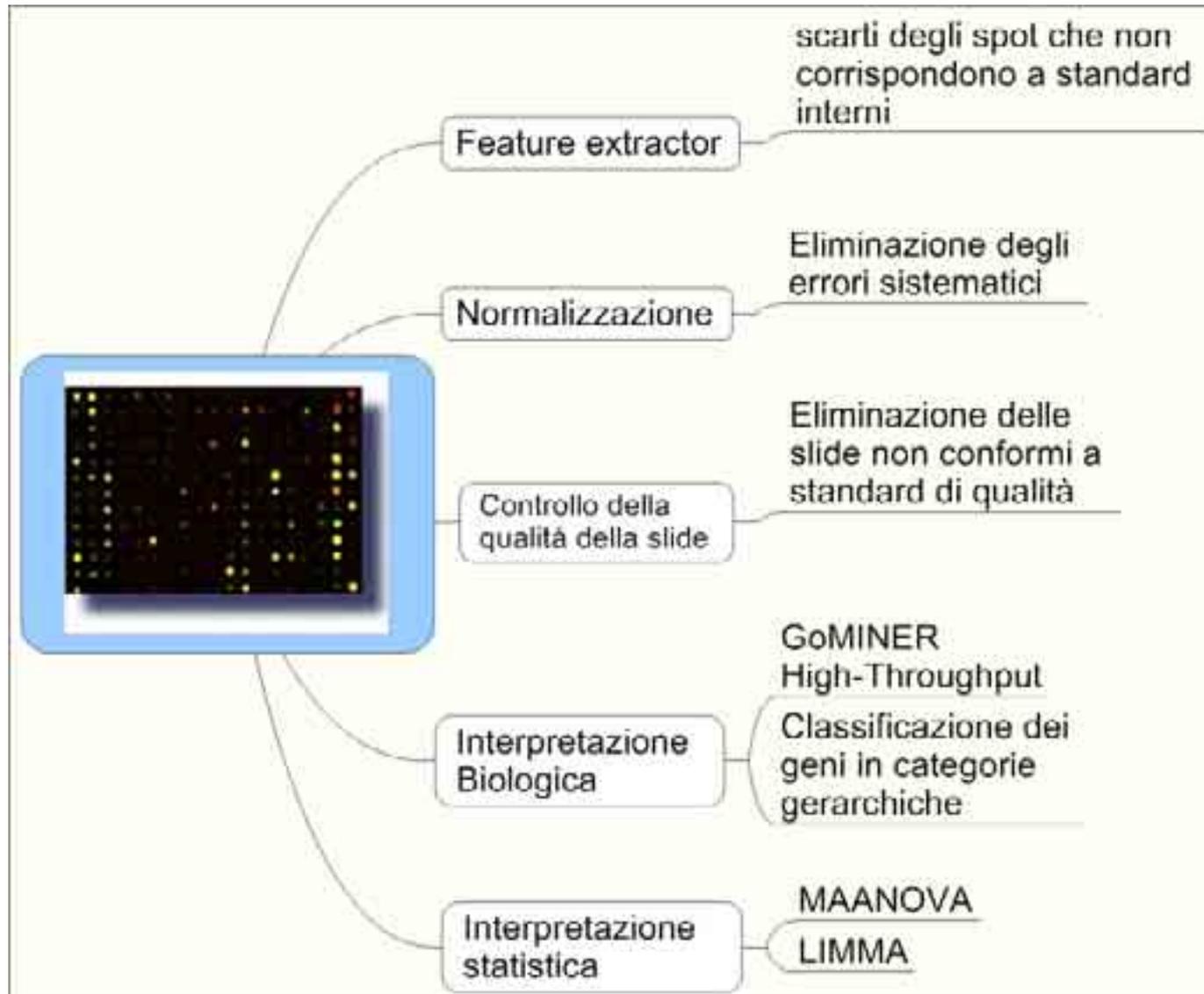


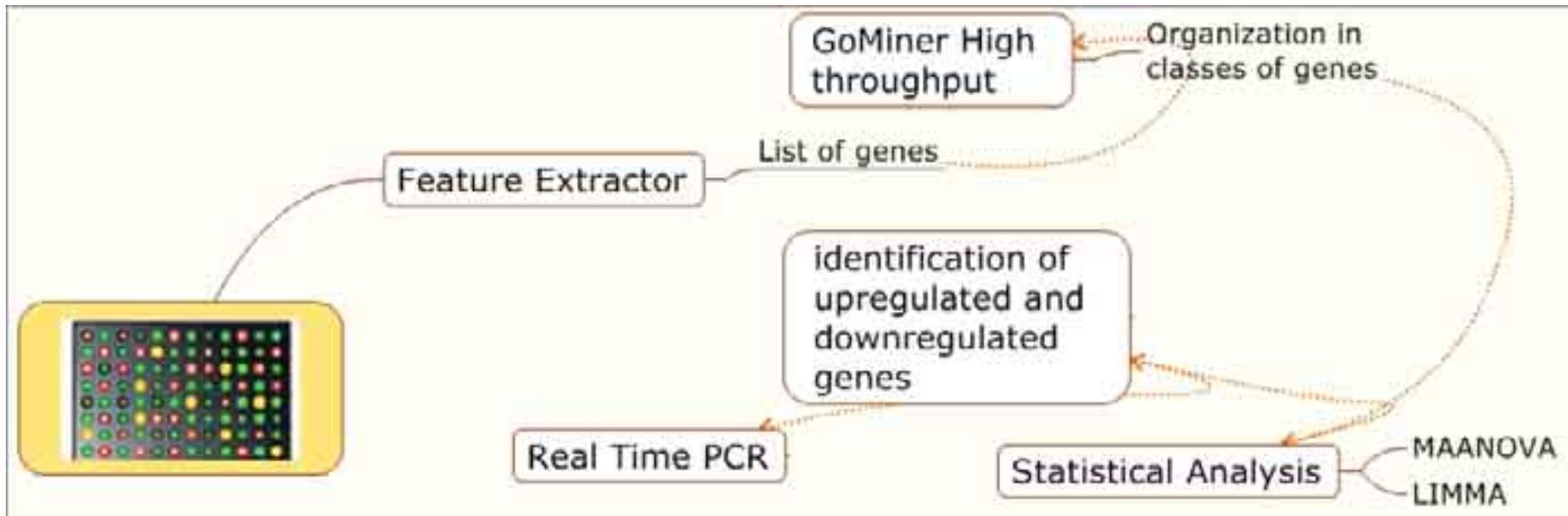
Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH

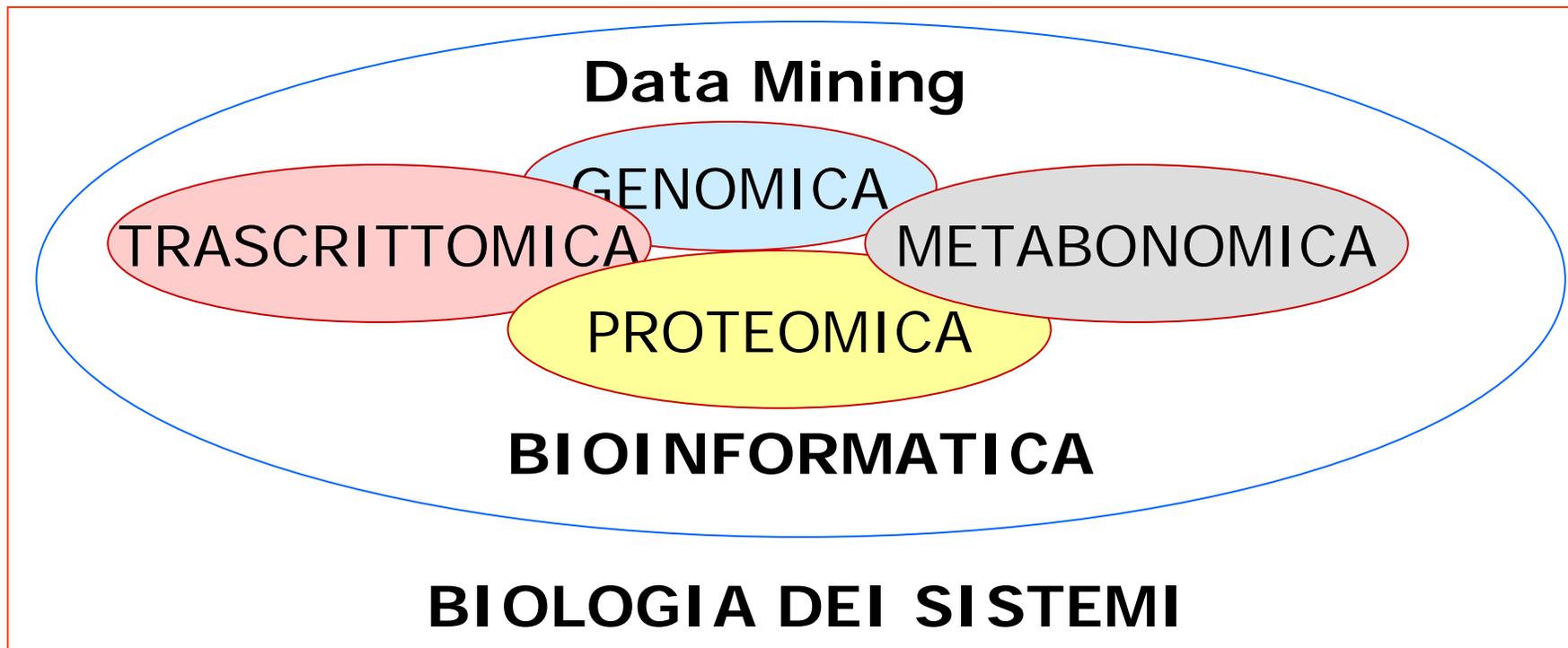


Microarray Technology









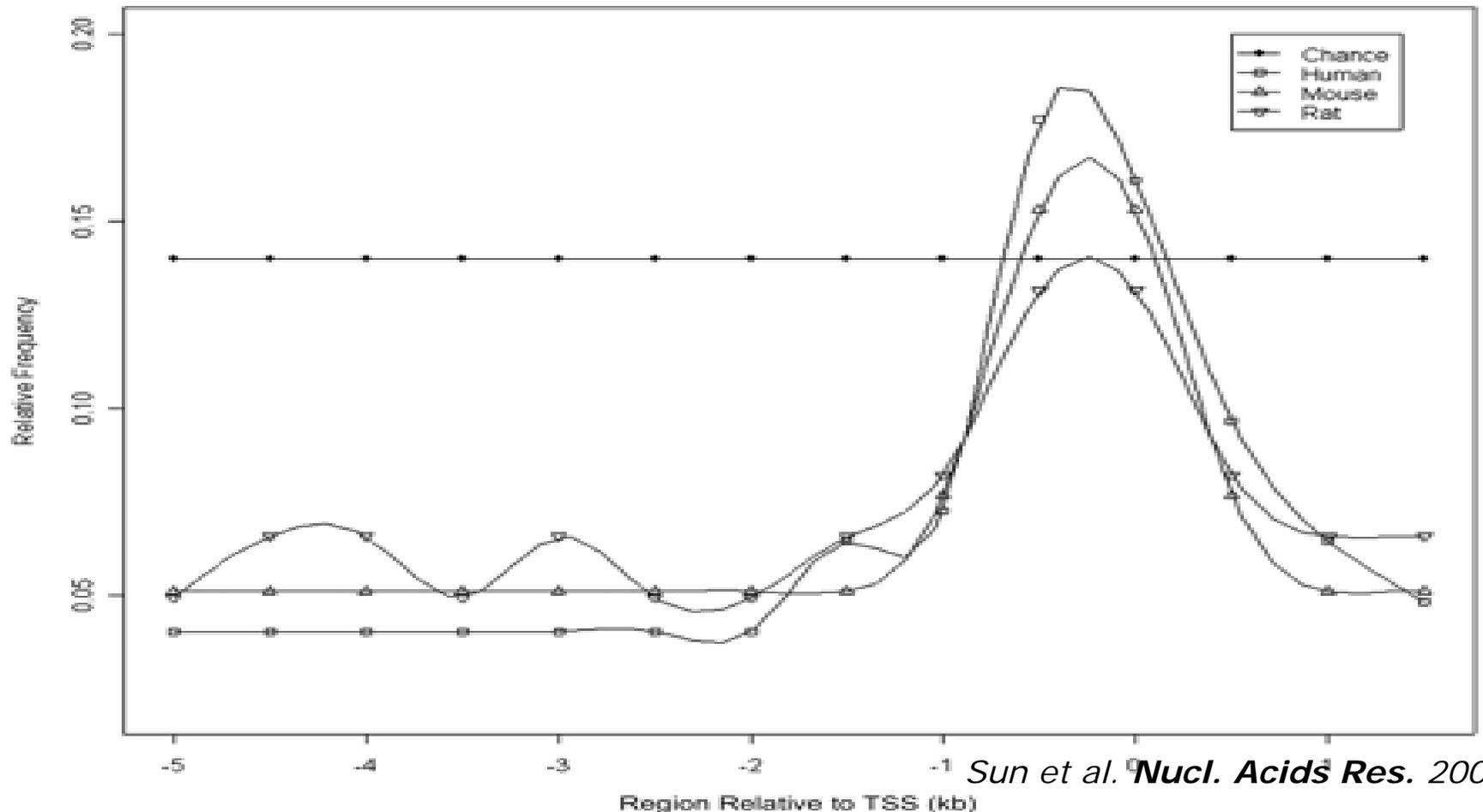
**La tossicogenomica per evidenziare e superare i
limiti della sperimentazione animale**

Profili genici in risposta alla esposizione a diossina

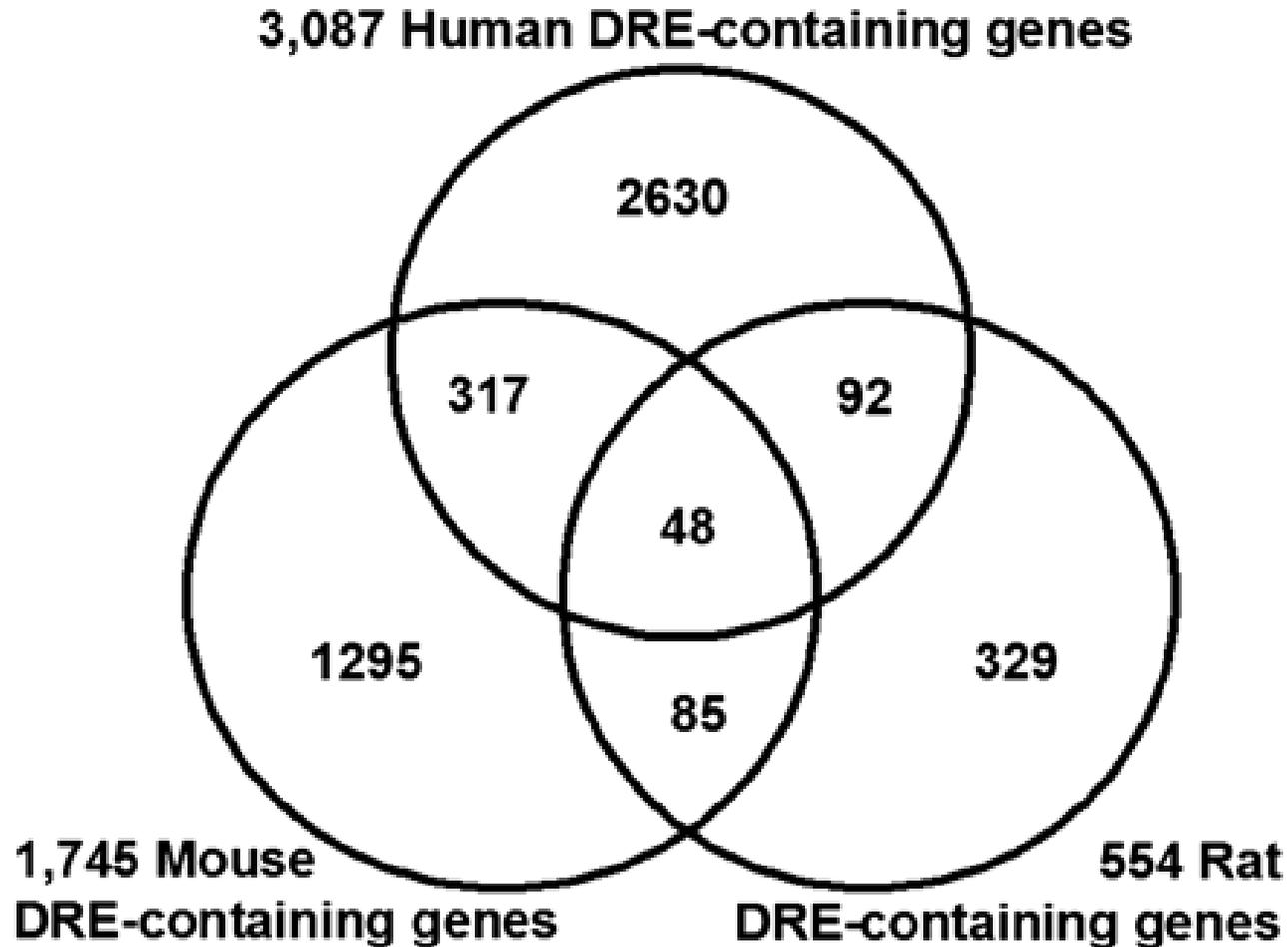
Filtering Condition	Human	Mouse	Rat
Unambiguous promoter sequence extracted from UCSC Genome Browser	17882 genes	11697 genes	3896 genes
↓			
DRE MS score > 0.8548	8290 genes	5238 genes	1837 genes
↓			
Contains DRE located within -1,500 bp to TSS	5763 genes	3539 genes	1190 genes
↓			
TSS annotated separately from start of CDS	5489 genes	3182 genes	1017 genes

Sun et al. Nucl. Acids Res. 2004

Profili genici in risposta alla esposizione a diossina



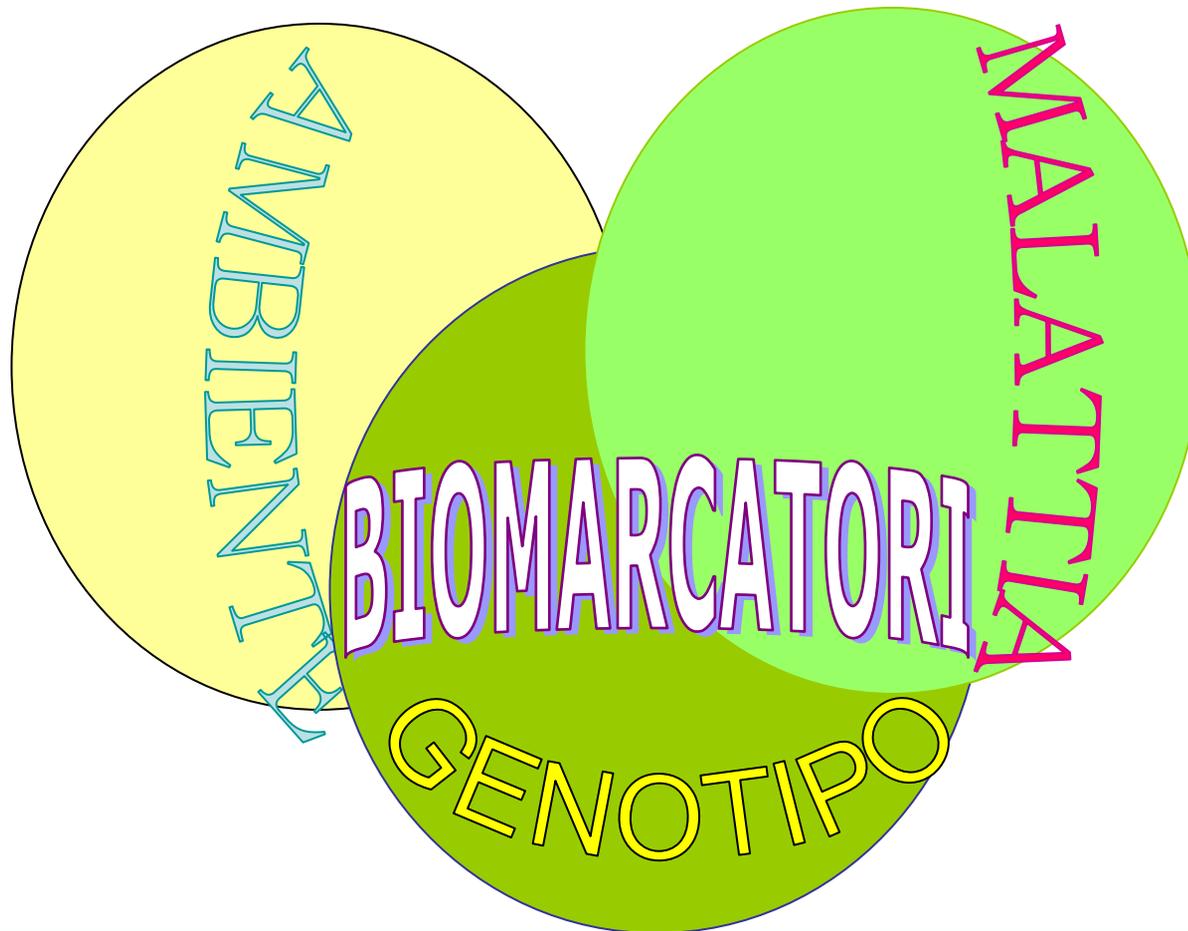
Profili genici in risposta alla esposizione a diossina



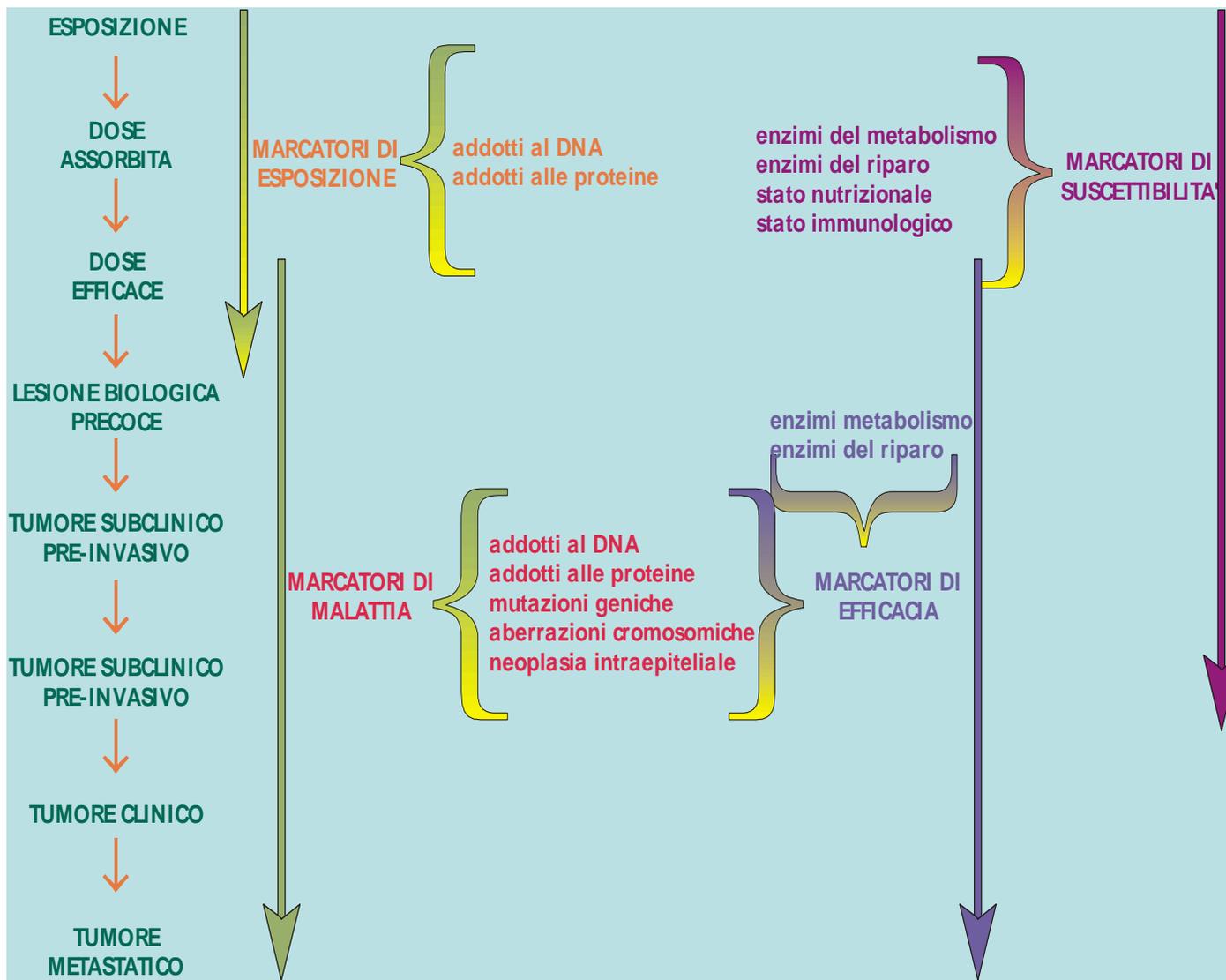
Sun et al. Nucl. Acids Res. 2004

**La tossicogenomica come strumento per studiare
gli scenari espositivi**

Come i biomarcatori possono essere usati per misurare la quantità degli effetti che influenzano o predicono la malattia

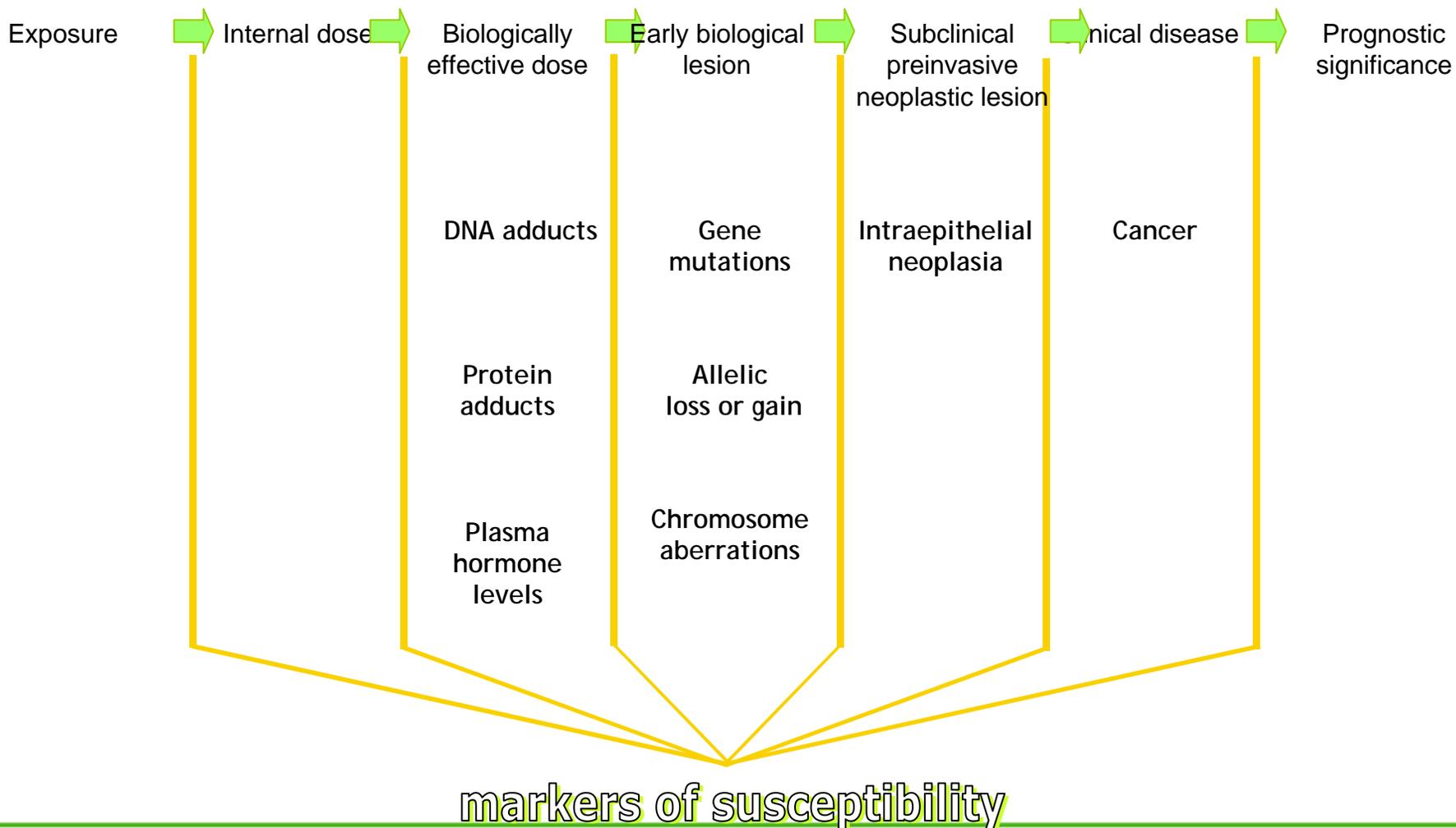


Marcatori di rischio, diagnostici, prognostici e di efficacia del trattamento



markers of exposure

markers of disease



BIOMARCATORI di esposizione e rischio

- Ad un eccellente biomarcatore di rischio si richiede che abbia:
 - **buona sensibilità specificità e accuratezza**
 - **facile discriminazione tra gruppi ad alto rischio e a basso rischio**
 - **facile identificazione mediante tecniche non invasive o quanto meno poco invasive**
 - **facile quantificazione**
 - **espressione ben differenziata fra tessuto normale e ad alto rischio.**
- Nonostante siano già stati descritti alcuni indicatori biologici per monitorare l'esposizione professionale o occasionale alle radiazioni, nessuno di questi è interamente predittivo del rischio e, soprattutto, nessuno mostra tutte le prerogative di un efficace marcatore del rischio.

La validità dell'approccio

- L'espressione genica è alterata direttamente o indirettamente dall'esposizione ambientale
- L'espressione di alcuni geni è essenziale per lo sviluppo della malattia
- Le variazioni dell'espressione genica sembrano correlare con maggiore sensibilità e specificità all'esposizione di altri endpoint patologici
- I profili genici specifici di una esposizione (fingerprints) possono essere utilizzati come
 - Biomarcatori di esposizione
 - Biomarcatori di rischio
 - Biomarcatori di stadio preclinico

I nuovi approcci

- Committee on Environmental Exposure Technology Development
 - Toolbox di metodi che possono essere utilizzati da soli o in combinazione per incrementare la stima dell'esposizione e l'impatto sulla salute

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE PERSONALIZZATA

Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH

Table 1. A toolbox of promising exposure assessment technologies and activities for integration in human environmental health research.

Technology	First generation activities	Second generation activities
All technologies	Identify priority diseases, plausible environmental exposure factors (including dietary and lifestyle factors, infectious agents, genetic determinants, biologic pathways, and model systems); Identify and review available scientific literature and databases in government, academia, and industry; Convene a workshop of experts to establish research priorities.	Develop background ranges and study population distribution of parameters for priority environmental exposures, response parameters, and genetic variants.
Environmental sensors	Develop and validate <i>in vitro</i> sensors for detecting and quantifying priority environmental exposures; Develop analytic tools and approaches to link environmental data across multiple scales, from macroenvironmental to personal.	Develop multipoint sensors for continuous monitoring of priority environmental exposures; Develop integrated sensor networks.
GIS technology	Select priority environmental and population data sets and develop GIS displays; Develop and apply modeling and mapping tools to link environmental and personal exposure data to identify at risk populations.	Initiate studies using environmental and biologic sensors and other exposure assessment methods to generate GIS displays for individualized exposure assessment in targeted studies.
Biologic sensors	Develop wearable personal sensors for monitoring activity patterns; Develop data management and analytic tools to support biologic sensing devices; Develop <i>in vitro</i> diagnostic sensors for monitoring early biologic responses to priority environmental factors.	Develop deployable <i>in vivo</i> (intravascular and transcutaneous) sensors for monitoring biologic responses to priority exposures; Develop sensor networks.
Toxicogenomics ^a	Select preferred technology platforms; Develop data and technology standards; Develop improved methods of sample preparation and analysis (throughput); Initiate human and animal studies to develop molecular signatures as markers of exposure, response and susceptibility, and define disease processes.	Conduct human and animal studies to validate molecular signatures as markers of exposure, response and susceptibility, and define biologic response pathways for priority exposures and responses.
Body burden assays	Develop and apply assays to quantify priority exposures in biologic samples; Improve methods of sample preparation and analysis; Improve sample matrix selection, and assay sensitivity and selectivity.	Develop and apply new methods to assess biologically effective doses for priority exposures and mixtures; Conduct studies to link body burden with biologically effective dose and environmental levels for priority exposures.

New methods, and improvements to existing methods, to personalize exposure assessment in human health research. Specific activities needed to enhance technology development for exposure assessment are identified as first generation (0–5 years from today) and second generation (5–10 years from today).

^aRefers to global analysis of genes, gene expression transcripts (transcriptomics), proteins (proteomics), and metabolites (metabolomics).

Fonte: Weis et al.
Env. Health Perspect.
113, 2005

Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH

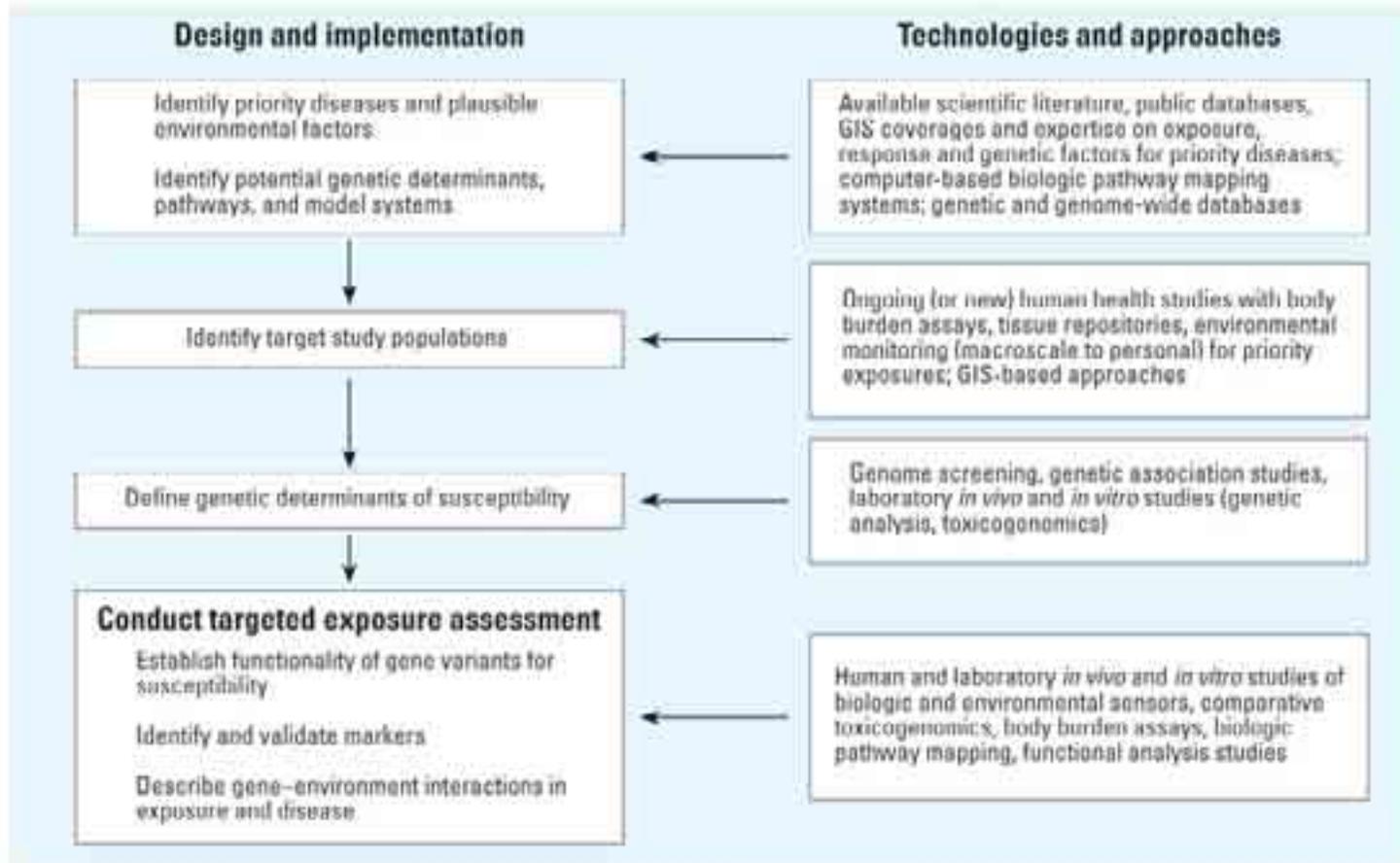


Figure 2. Conceptual strategy for integration of new exposure assessment technologies in human environmental health research.

Fonte: Weis et al.
Env. Health Perspect. 113, 2005