

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

## **INTRODUZIONE ALLA TOSSICOLOGIA E ALLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO**


**Emanuela Testai**

Istituto Superiore di Sanità

## Indice

- 
1. Definizione e principi generali di tossicologia
  2. La valutazione del rischio tossicologico
  3. Test di tossicità
  4. Biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità
  5. Case studies

## TOSSICOLOGIA



*'...Una scienza che può essere spiegata con due sole lezioni, ognuna delle quali dura dieci anni....'(A.J.Lehman)*

**scienza interdisciplinare** che studia gli effetti avversi dovuti all'interazione tra un organismo e qualsiasi sostanza in grado di modificarne l'equilibrio attraverso una alterazione dei processi biochimici e molecolari.

## Dalla Tossicologia come l'arte dei veleni e delle pozioni....

Etimologia del termine:

dal greco *toxon* =freccia per il veleno utilizzato sulla punta della freccia per avvelenare il nemico in battaglia o

dal nome dell'albero *taxus*, dal cui legno si ottenevano le frecce migliori e le cui bacche erano velenose e utilizzate per intingere la punta della freccia

...alla Tossicologia come scienza...

## TOSSICOLOGIA : UNA SCIENZA IN EVOLUZIONE

Dalla osservazione e catalogazione dei fenomeni ....  
....alla sperimentazione (analisi, comprensione dei  
fenomeni, deduzione).....

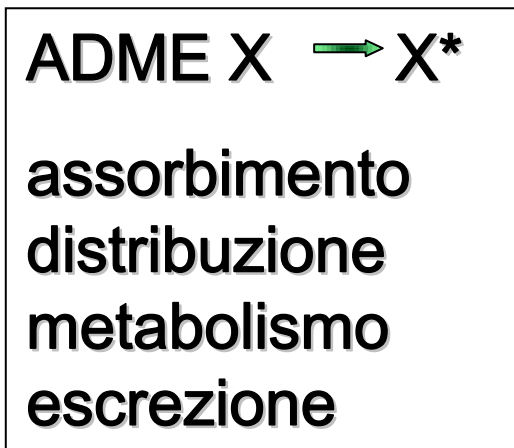
...fino alla quantificazione degli eventi..... ‘

***Misura ciò che può essere misurato e rendi  
misurabile ciò che non lo è ‘ (Galileo)***

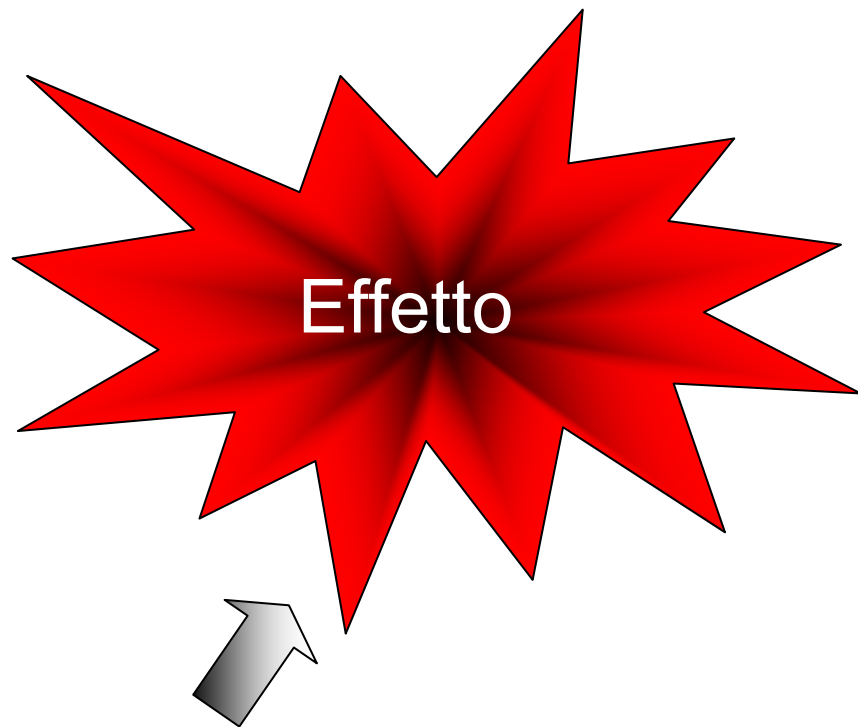
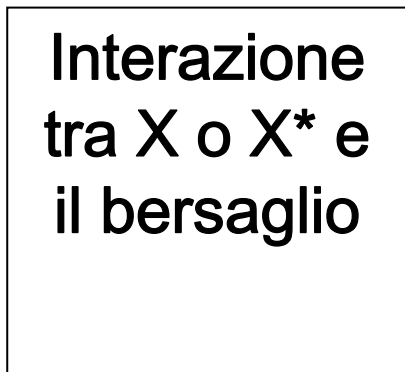
... alla applicazione della conoscenza acquisita per la  
protezione della salute umana e dell'ambiente.

E  
s  
p  
o  
s  
i  
z  
i  
o  
n  
e

Fase farmaco/  
tossico cinetica

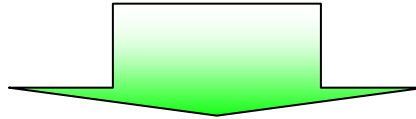


Fase farmaco/  
tossico  
dinamica



Le alterazioni dell'equilibrio omeostatico che possono portare alla comparsa di effetti avversi vengono evidenziate attraverso **test tossicologici** che possono essere distinti

- per la durata dell'esposizione (acuta, cronica)
- per il tipo di effetti evidenziati (end-point diversi)
- per le tecniche utilizzate (analitici, biologici).....



L'obiettivo è quello di identificare i possibili rischi per la salute dell'uomo e dell'ambiente derivanti dalla esposizione all'agente potenzialmente tossico

### Gli studi tossicologici possono essere condotti:

- ⇒ Su animali da laboratorio (***in vivo***)
- ⇒ Su organi e tessuti prelevati da animali (***ex vivo***)
- ⇒ Su colture cellulari, microorganismi, frazioni subcellulari, enzimi purificati (***in vitro***)
- ⇒ Con modelli matematici e previsionali (***in silico***)
- ⇒ Su popolazioni (**studi epidemiologici, studi clinici, studi sul campo**)



### Studi Sperimentali vs. Studi epidemiologici

- **Sperimentali.** Si somministra la sostanza con precise modalità (dose, tempo, via ecc.) e se ne studiano gli effetti tossici. L'esposizione alla sostanza è controllata. L'esposizione ad altre sostanze è eliminata o comunque controllata (gruppi di controllo)
- **Epidemiologici.** Si studiano gli effetti di una sostanza su popolazioni umane che sono comunque esposte alla sostanza, presente nell'ambiente o somministrata a scopo terapeutico (farmaci, vaccini). L'esposizione non può essere controllata (tranne che per i farmaci). Gli individui sono contemporaneamente esposti a molte altre sostanze o condizioni che possono influenzare l'effetto tossico

## STUDI EPIDEMIOLOGICI

### Vantaggi:

Condizioni di esposizione reale

Effetti misurati sulla specie bersaglio

Spettro completo delle suscettibilità individuali della specie

Valutazione di eventuali interazioni tra sostanze diverse

### Svantaggi:

Costosi e di lunga durata

Necessità di numeri molto elevati per evidenziare aumenti di rischio

Effetti misurati (a posteriori): presenza di malattie, decessi

Difficoltà nel definire l'esposizione (presenza di fattori confondenti)

## STUDI TOSSICOLOGICI in vivo

### Vantaggi:

Condizioni di esposizione facilmente manipolabili

Possibilità di misurare effetti diversi

Possibilità di variare parametri (età, sesso, specie, dieta, altri fattori modulatori la risposta)

Potenzialità di valutare i meccanismi

### Svantaggi:

Possibili differenze di specie

Incertezza della rilevanza dell'effetto nell'uomo

Limitata variabilità interspecifica

Condizioni di esposizione irrealistiche

## STUDI in silico

### Vantaggi:

Costi e tempi contenuti

Possibilità illimitata di variare parametri e simulare scenari diversi

Nessun uso di animali da laboratorio

### Svantaggi:

Necessità di validazione con dati sperimentali 'classici'

Estrema generalizzazione dei fenomeni (una semplice variazione nella configurazione di una molecola determina cambiamenti radicali nella sua attività biologica)

Estrema dipendenza dalle conoscenze umane pregresse

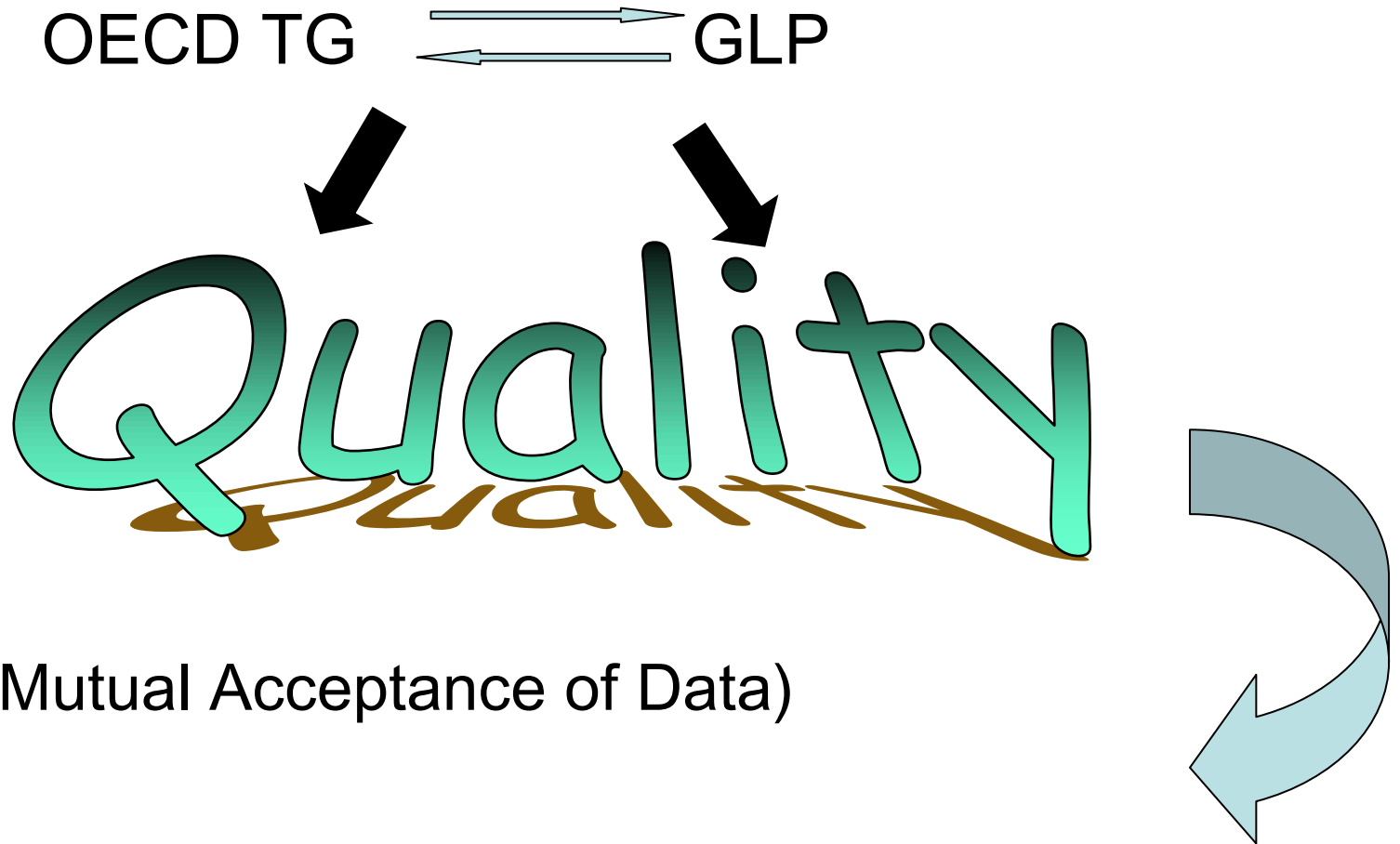
### Studi di tossicità vs. tempo di esposizione

- ✓ **acuta**: singola somministrazione (episodi di avvelenamento e intossicazione acuta);
- ✓ **a breve termine** (dosi ripetute o **subacuta**): 14-28 giorni (consumo di cibi contaminati);
- ✓ **prolungata** (10-25 % della vita dell'animale, **subcronica**): 3 mesi (nel ratto e nel topo) 1 anno (nel cane beagle) (contaminazioni ambientali stagionali)
- ✓ **cronica** (> 50% della vita): 2 anni nel ratto; 18 mesi nel topo (in genere associata a studi di cancerogenesi) (additivi alimentari, qualità dell'aria)

## Aspetti regolatori

Gli studi inclusi nei Dossier devono essere condotti secondo quanto descritte nelle specifiche **OECD Test Guidelines** in centri di ricerca certificati per le **GLP (Good Laboratory Practice)**

I centri di ricerca e le CRO sono certificati in Europa dalle **Unità di Monitoraggio** nazionali che li ispezionano ogni due anni, facendo anche audizione di studi specifici.



MAD (Mutual Acceptance of Data)

No duplication of regulatory testing  
Easier commercial exchanges

## Lista delle OECD Test Guidelines adottate

### Acute Toxicity:

402: Acute Dermal Toxicity, 1987

403: Acute Inhalation Toxicity, 1981

404: Acute Dermal Irritation/Corrosivity, 2002

405: Acute Eye Irritation/Corrosivity, 2002

406 : Skin sensitisation, 1992

420: Acute Oral tox.-Fixed Dose Method, 2001

423: Acute Oral tox.-Toxic Class Method, 2001

425: Acute Oral tox.-Up and Down Method, 2001

429: Skin sensitisation: LLNA, 2002



### Repeated Dose Toxicity:

407: 28-day Oral Toxicity in rodents, 1995

408: 90-day Oral Toxicity in rodents, 1998

409: 90-day Oral Toxicity in non rodents, 1998

410: Dermal Toxicity: 21-28 day Study, 1981

411: Subchronic Dermal Tox.: 90 day Study, 1981

412: Inhalation Tox.: 28-day or 14-day Study, 1981

413: Subchronic Inhalation Tox.: 90-day Study, 1981

425: Acute Oral tox.-Up and Down Method, 2001

451: Carcinogenicity Study, 1981

452: Chronic Toxicity Study, 1981

453: Combined,  
1981

### Repro- and Development Toxicity:

414: Prenatal Developmental Tox., 2001

415: One-generation Reprotox, 1983

416: Two-generation Reprotox, 2001

421: Repro/Developmental Toxicity Screening Test, 1995

422: Combined Repeated Dose with Repro/Developmental Toxicity Screening Test, 1996

### Neuro- toxicity:

418: Delayed Neurotox.of OP following Acute Exposure, 1995

419: Delayed Neurotox.of OP: 28-day Repeated Dose Study, 1995

424: Neurotoxicity Study in rodents, 1997

### Toxico- kinetics:

417: Toxicokinetics, 1984

428: Test in vitro di assorbimento cutaneo, 2004

427: Test in vivo di assorbimento cutaneo, 2004

### Genetic Toxicology:

- 471: Bacterial Reverse mutation, 1997
- 473: In vitro mammalian Chromosomal Aberration Test, 1997
- 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 1997
- 475: Mammalian Bone Marrow Chrom. Aberration Test, 1997
- 476: In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test, 1997
- 477: Sex-Linked Recessive Lethal test in *D. melanogaster*, 1984
- 478: Rodent Dominant Lethal Test, 1984
- 479: In vitro SCE Assay in mammalian cells, 1986
- 480: *S. cerevisiae*, gene mutation assay, 1986
- 481: *S. cerevisiae*, Mitotic Rec. assay, 1986
- 483: DNA damage and Repair, UDS in mammalian Cells in vitro, 86
- 483: Mammalian Spermatogonial Chrom. Aberration Test, 1997
- 484: Mouse Spot Test, 1986
- 485: Mouse Heritable Translocation Assay, 1986
- 486: UDS Test with Mammalian Liver Cells in vivo, 1997

## L'uso responsabile di animali da laboratorio nei test tossicologici

Esiste una legislazione in merito che regola le condizioni di stabulazione e trattamento degli animali (D.Lvo 116/92- che recepisce la corrispondente Direttiva Europea) 'Animal Welfare' (attualmente in revisione)

Quando possibile e appropriato si richiede di applicare il **Principio delle 3 R** : **reduction** (riduzione del numero di animali), **refinement** (miglioramento delle condizioni dei test per limitare le sofferenze), **replacement** (sostituzione dei test in vivo con test in vitro).

Nel Regolamento REACH, le informazioni richieste sono dettagliate negli Annexes VI -X e l'Annex XI regole generali su come le richieste standard debbano essere adattate/interpretate.

Per le **sostanze nuove** sono di solito pianificati e presenti nei dossier studi *ad hoc*.

Per gli **existing chemicals**, sono spesso disponibili molti studi, nessuno dei quali però disegnato per fornire le informazioni richieste per condurre una adeguata valutazione del rischio. Spesso sono inoltre di qualità scarsa e non in compliance con TG e GLP. In questi casi la valutazione è decisamente più complessa e delicata.

Infatti, *to achieve a high level of protection of human health and the environment while limiting the need for additional testing*, tutti i dati disponibili sulle proprietà intrinseche della molecola devono essere valutate e solo quando i dati disponibili siano del tutto inadeguati nel soddisfare le richieste del REACH, può e deve essere richiesta la presentazione di studi aggiuntivi.

Comunque i nuovi test richiesti devono essere, ove possibile, condotti con metodi alternativi all'uso degli animali  
In questo contesto, l'Articolo 13 (1) del REACH stabilisce che

***information on the intrinsic properties of substances may also be generated by means other than tests, provided that the conditions set out in Annex XI are met. In particular for human toxicity, information shall be generated whenever possible by means other than vertebrate animal tests, through the use of alternative methods, for example, in vitro methods or qualitative or quantitative structure-activity relationship models or from information from structurally related substances (grouping or read-across).***

***Suitable in vitro test methods*** sono nel REACH indicati come :

- **Metodi validati** (*in vitro* tests per la corrosione della pelle e test *idi genotossicità n vitro* come l' Ames test)  
Le informazioni ricavate dai test in vitro validati sono valide a tutti gli effetti
- **Test *in vitro*** che soddisfano a criteri di pre-validazione accattati a livello internazionale (es. criteri ECVAM per entrare nel processo di validazione).  
Le informazioni derivate da questi studi avanzati possono fornire informazioni estremamente utili dal punto di vista meccanicistico e essere utilizzati *inter alia* per facilitare l'interpretazione della rilevanza dei dati ottenuti nei test con animali da laboratorio nell'estrapolazione all'uomo.



L'Annex VI del REACH descrive uno schema generale da seguire da parte del registrante per soddisfare le richieste per una data sostanza:

- Step 1:** Raccogliere tutte le informazioni disponibili e condividerle
- Step 2:** Considerare le informazioni necessarie
- Step 3:** Identificare i 'data gaps'
- Step 4:** Generare i dati mancanti o proporre una 'testing strategy'

# Scheme IA

## Annex VII

### Step 1 Data Gathering

All Available Health & Environmental Information  
-physico-chemical data  
- human data  
-in vitro/in vivo data  
-read-across SAR, QSAR  
**-Exposure data**

### Step 2 Information Needs

Annex VII:  $\geq 1$  tpa <10tpa  
  
Annex XI

### Step 3 Identify information gaps

#### Step 3a Phys-chem properties

Is the available information on phys-chem. adequate?

No

Fill data gaps by conducting appropriate test on phys-chem. properties

Yes

Yes

Is the substance non-phase in substance?

No

Yes

#### Step 3c Toxicological and ecotoxicological properties

Is the available information adequate for Annex VII?

Yes

Record C&L and PBT conclusion

No

**Step 4 Generate new information**  
*Go to scheme IIA*

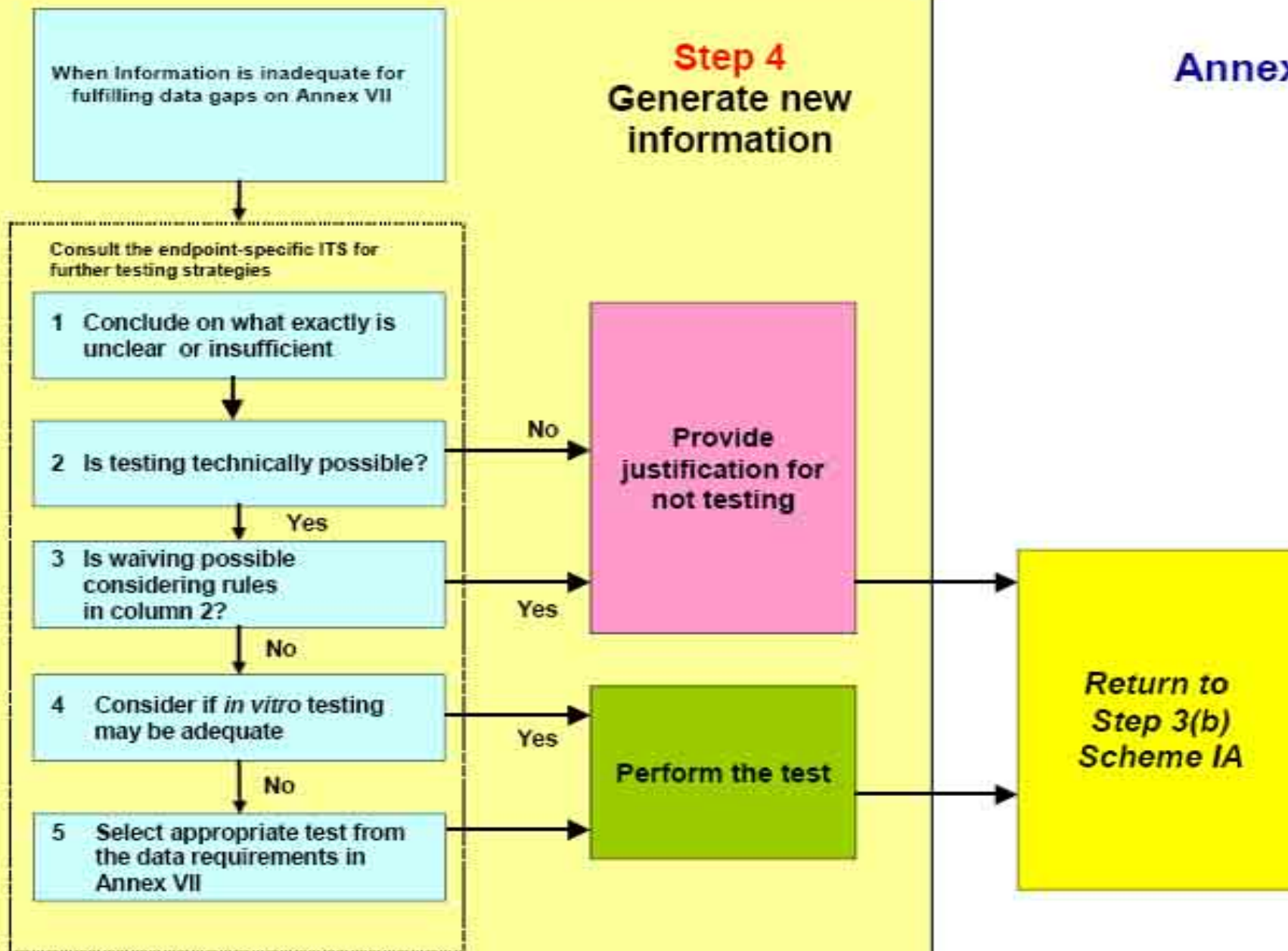
#### Step 3b

Do all available information (step 1) and newly produced data on Phys-Chem properties allow to:  
  
Predict that the criteria for category 1 or 2 CMR or PBT/vPvB are likely to be met  
OR  
Indicate that use(s) are dispersive or diffuse  
AND  
Predict that classification criteria for any human health or environmental effects endpoint likely to be met

No

no more information required  
Record C&L conclusions

## Step 4 Generate new information



### Step 1 Data Gathering

All Available Health & Environmental Information  
- physico-chemical data  
- human data  
- in vitro/in vivo data  
- read-across SAR, QSAR  
Exposure characteristics

### Step 2 Information Needs

Annex VII:  $\geq 1$  tpa  
Annex VIII:  $\geq 10$  tpa  
Annex IX:  $\geq 100$  tpa  
Annex X:  $\geq 1000$  tpa

Annex XI

### Step 3 Identify information gaps

consider if information is adequate to

Yes  
Assess C&L,  
PBT, vPvB?

Yes  
Derive  
DNEL / PNEC or dose  
descriptor?

Record  
DNEL / PNEC\*

Refine further  
effects information

### Step 4 Generate new Information/propose testing strategy

go to Scheme IIB

If classified

If classified

If PBT  
vPvB

Assessment of losses  
& emissions

Emission  
Estimates

Perform Emission  
Characterization

Emission  
adequately  
minimized?

Yes  
Authorization  
for specified  
uses

Further limitations of production/user  
emission

Exposure Scenario  
Use | Risk Management

Exposure Estimates

Perform  
Risk Characterization

Refine operational conditions  
and/or Risk Management

Refine Exposure  
Estimate assumptions

Adequate  
control?

\*For substances for which no DNEL / PNEC can be derived – perform a qualitative risk characterisation

Supply & Inform  
a) Supply Chain - eSD6  
b) Agency - C&L

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

## **INTRODUZIONE ALLA TOSSICOLOGIA E ALLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO**

**Emanuela Testai**

Istituto Superiore di Sanità

## Indice

1. Definizione e principi generali di tossicologia
-  2. La valutazione del rischio tossicologico
-  3. Test di tossicità
4. Biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità
5. Case studies

## Le richieste del REACH

### *Art. 10* - **Informazioni da comunicare ai fini della registrazione**

- a) un fascicolo tecnico contenente una serie di informazioni
- b) una relazione sulla sicurezza chimica (**Chemical Safety Report o CSR**)

Quando la sostanza è prodotta o importata con un quantitativo  $\geq 10$  ton/anno viene richiesto un **Chemical Safety Assessment (CSA)** al fine di definire le condizioni d'uso e le misure di gestione degli eventuali rischi

**Il Chemical Safety Assessment (CSA)** comprende tra le varie fasi:

La valutazione dei pericoli per la salute umana compresa la classificazione e la definizione dei “Derived No Effect Levels” (DNELs) (Sezione B.8 e Parte R.8)



## LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO

**Un Processo in 4 fasi:**

- **Hazard identification (usato per la C&L)**
- **Relazione Dose-risposta**
- **Valutazione della esposizione**
- **Risk characterization**

La procedura è definita a **livello EU**: (Commission Directive 93/67/EEC; Council Regulation (EEC) 793/93; TGD Technical Guidance Document on Risk Assessment, 2003; Commission Regulation (EC) No. 1488/94.

La stessa procedura dovrà essere seguita secondo quanto stabilito dal **regolamento REACH**

## HAZARD IDENTIFICATION

Che differenza tra pericolo e rischio?

Il pericolo è una caratteristica intrinseca della sostanza.

Il rischio è la probabilità di andare incontro agli effetti avversi che la sostanza può provocare, in seguito ad esposizione.

Riflette l'Aspetto Qualitativo della valutazione e risponde alla domanda:

Che tipo di effetti avversi induce la sostanza ?

### Test di Tossicità Acuta

Un test di tossicità acuta serve alla definizione della tossicità intrinseca e della tossicità relativa rispetto ad altre sostanze.

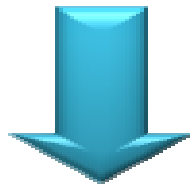
Il parametro che si misura è la mortalità

**LD<sub>50</sub>** È la dose singola che si può prevedere provochi la morte del 50% degli animali trattati. Non è un valore costante (dipende dalla specie, dal ceppo, dal sesso e dall'età); può essere considerato un termine statistico che descrive la risposta (in termini di letalità) ad un composto in una particolare popolazione e in specifiche condizioni sperimentali.

Un test di tossicità acuta serve alla definizione della **tossicità intrinseca** e della **tossicità relativa** rispetto ad altre sostanze. Per questo motivo la **classificazione di tossicità** delle sostanze chimiche per le varie vie di esposizione (orale, cutanea, inalatoria) viene fatta in base ai risultati di DL50.

## Studi di tossicità acuta

- \* Studi di tossicità acuta su ratto (singola somministrazione LD<sub>50</sub> orale, inalatoria, cutanea)
- \* Studi di irritazione cutanea e oculare su coniglio
- \* Studi di sensibilizzazione su guinea pig



**classificazione ed etichettatura**

## Classificazione UE (Etichettatura delle Sostanze pericolose)

DL <sub>50</sub> orale, ratto (mg/kg)	DL <sub>50</sub> cutanea, ratto/coniglio (mg/kg)	CL <sub>50</sub> inalatoria ratto (mg/lit per 4 ore)	Classe di tossicità
≤ 25	≤ 50	≤ 0,5	Molto tossico
25 - 200	50 - 400	0,5 - 2	Tossico
200 - 2000	400 - 2000	2 - 20	Nocivo

Sostanze con DL<sub>50</sub> maggiori non si classificano

Nei test approvati dall'OECD e altri organismi internazionali (inclusa la UE) oggi si usa un numero inferiore di animali perché non si ritiene necessario avere una determinazione puntuale della LD<sub>50</sub>. Si calcola che con questi nuovi metodi si sia ottenuto un risparmio del 30-50% di animali.

LG OCSE n°423: 5 animali di un solo sesso (femmine) ad una **dose fissa**, che definisce uno degli intervalli utilizzati per la classificazione di tossicità della UE :

5-50-200-2000 mg/kg bw (non tossico, nocivo, tossico, molto tossico). L'end-point rimane la mortalità.

Si trattano 5 animali ad una delle dosi fisse:

se nessun (o 1 animale) muore non è necessario proseguire.

se muoiono 2-5 animali è necessario testare la dose inferiore.

La mancata conduzione/presentazione di uno studio non necessariamente corrisponde ad un data gap, purché siano fornite adeguate giustificazioni (basate su argomentazioni di tipo scientifico o da indicazioni specifiche nel Regolamento REACH e/o nei vari RIP)

Tossicità acuta per via inalatoria :

Lo studio può non essere condotto sulla base delle **caratteristiche chimico-fisiche** (disponibili dati sulla pressione di vapore, sulla distribuzione delle particelle-MMAD per la respirabilità).

Se la sostanza è corrosiva, gli studi di tossicità inalatoria non sono ammessi.

E' possibile anche chiedere un **read across** con dati relativi a sostanze che abbiano caratteristiche strutturali simili (ma non solo; se l'entità del read across è rilevante sono necessari alcuni '**bridging studies**' che lo supportino).'



## 2. RELAZIONE DOSE-RISPOSTA

### Aspetto Quantitativo

***Omnia venenum sunt: nec sine veneno quicquam existit. Dosis sola facit ut venenum non sit ' (Paracelso)***

A quale concentrazione si osserva l'effetto ?

Il livello 'efficace' si raggiunge attraverso:

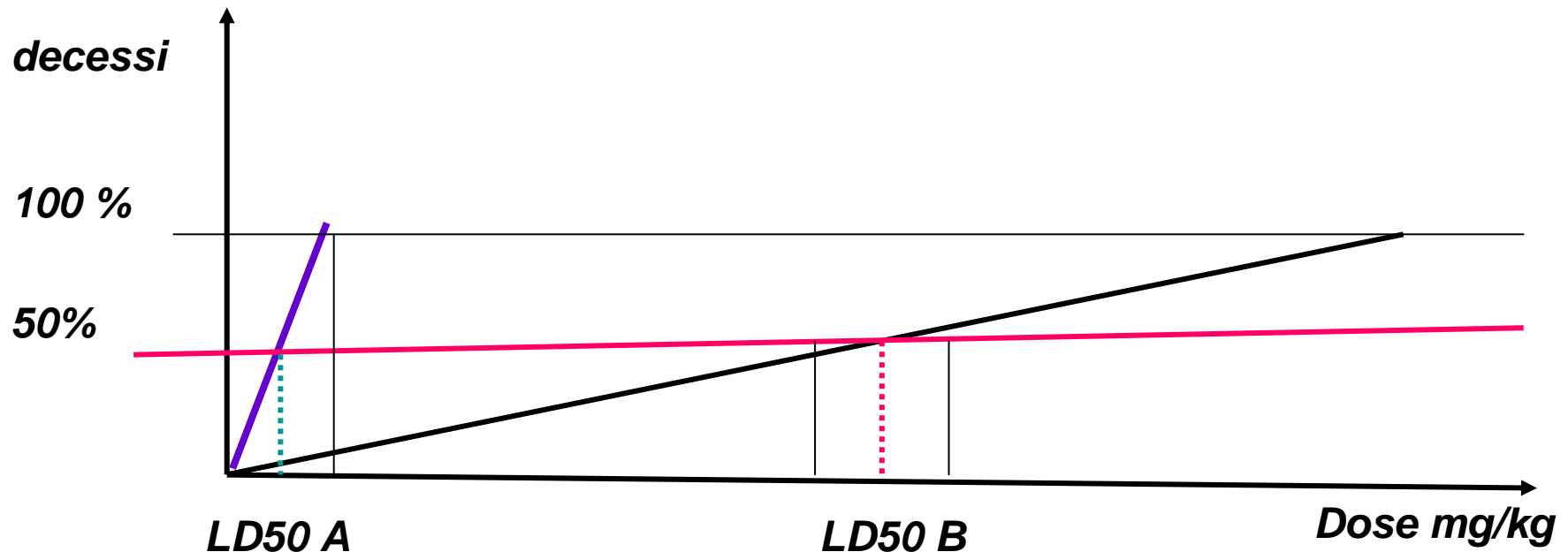
Una singola esposizione (acuta e generalmente elevata)

➡ incidenti, avvelenamenti

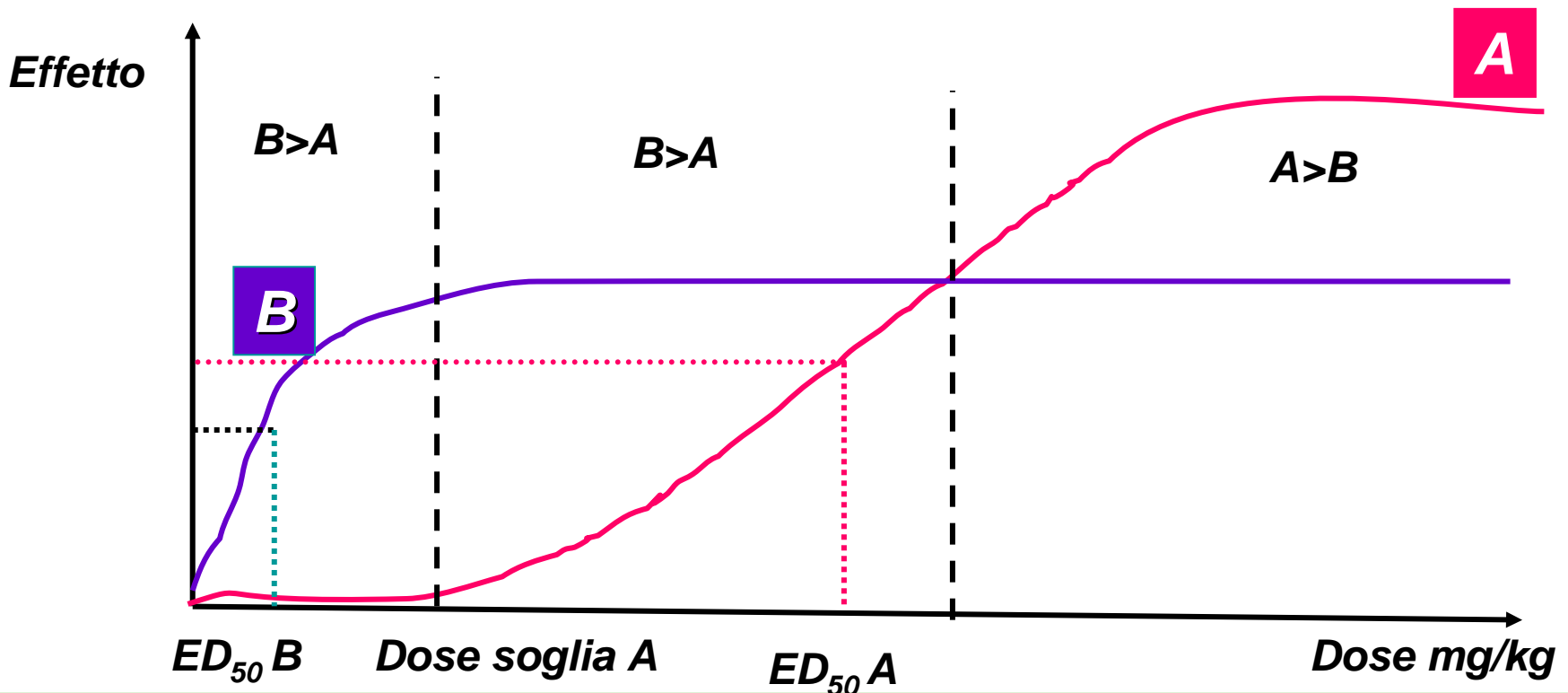
Esposizioni prolungate (basse dosi ripetute nel tempo non tossiche singolarmente ➡ accumulo del tossico e/o accumulo del danno)

## Relazione dose-effetto. Curve dose-risposta

- La  $LD_{50}$  e/o la  $ED_{50}$  sono il primo esempio di curva dose-risposta espressione della relazione dose-effetto.
- Importanza della Forma della curva/ Pendenza della retta. (curva/retta ripida: piccole variazioni di concentrazione determinano grandi differenze nella risposta)



- Dose soglia:** la dose al di sotto della quale non si manifesta tossicità (dipende dall'endpoint in esame). La dose soglia sull'effetto critico è la base per estrapolare i limiti di sicurezza.  $DE_{50}$  e dose soglia sono una misura della potenza di una sostanza tossica.



### Studi di tossicità ripetuta

Subacuta, subcronica, cronica (effetti non neoplastici)

Studi di cancerogenesi

Studi di tossicità riproduttiva e dello sviluppo

Tossicità speciale

### Studi di tossicocinetica: Trasversali a tutti gli effetti

Destino della sostanza nell'organismo ( $t_{1/2}$ , velocità e % di assorbimento ed eliminazione  $\Rightarrow$  dose interna e potenziale di bioaccumulo; metabolismo, differenze e rilevanza delle specie, specie chimica rilevante, dosi da usare nei test di ripetuta )

### Quale è l'Effetto Critico?

L'effetto critico può essere tale perché:

⇒ è presente alle dosi più basse.

⇒ è più rilevante dal punto di vista tossicologico

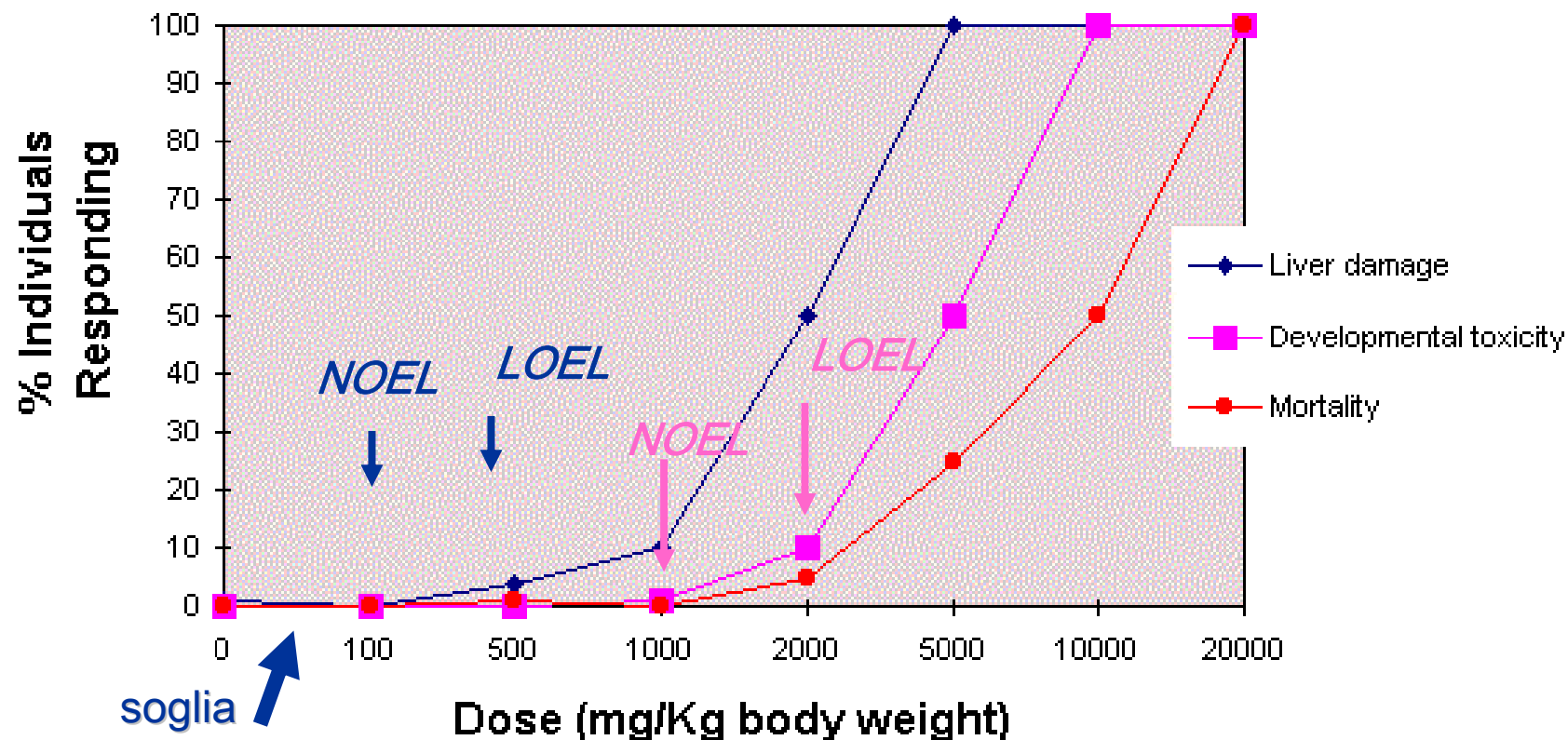
Dose-dipendenza dell'effetto ; Presenza di effetti correlati alle dosi più alte indicatori di effetto precoce (i.e. aumento delle transaminasi epatiche vs ipertrofia epatocellulare o necrosi)

Coerenza del quadro generale; Presenza degli effetti in un numero elevato di animali per gruppo; Presenza in entrambi i sessi

**La prevenzione dell'effetto critico vale a maggior ragione anche per gli altri effetti.**

Le curve dose-risposta variano con l'effetto tossico osservato  $\Rightarrow$  anche le dosi soglia variano.

## Dose/Response Curve for Non-Carcinogen



- **LOAEL** - L(owest) O(bserver) A(dverse) E(ffect) L(evel): il più basso livello di dose (esposizione) in cui si osserva un effetto.
- **NOAEL** - N(o) O(bserver) A(dverse) E(ffect) L(evel): il più alto livello di dose (esposizione) in cui si osserva assenza di effetti.

NOAEL e LOAEL si esprimono generalmente come: mg/kg  
peso corporeo/giorno

- **LOAEC e NOAEC** (Concentrazione): nelle matrici (mg/l, etc.)

## Sostanza somministrata

- Caratterizzazione chimico-fisica:
- contenuto in principio attivo e impurezze
- variabilità interlotto
- stabilità (intrinseca e nel veicolo)
- condizioni di conservazione (data di scadenza)

Effetto della formulazione:

- veicolo (acqua, salina, olio vegetale, glicole propilenico, cibo, ...)
- volume somministrato (limitato dalla taglia dell'animale)



## La via di somministrazione

- Gli effetti ottenuti con una via di somministrazione non sono *a priori* applicabili ad altre vie (diversa biodisponibilità e diversa tossicocinetica)
- E' importante utilizzare la/e via/e di esposizione più appropriate per mimare la condizione reale di esposizione umana (la via orale è quella più frequente)

## Gruppo di controllo

Per gli studi di tossicità ripetuta è indispensabile avere un gruppo di controllo (l'assenza determina l'invalidità dello studio)

Al gruppo di controllo viene generalmente somministrato il veicolo in cui è sciolta la sostanza test con le stesse modalità utilizzate per i gruppi di trattamento.

Il gruppo di controllo permette di misurare l'incidenza di effetti (patologie) non indotti dalla sostanza ma dovuti a fattori congeniti (età) e/o ambientali  $\Rightarrow$  comparazione statistica

## Quanti animali devono essere utilizzati in ogni test?

- Per identificare gli effetti tossici di una sostanza nei test tossicologici senza usare un numero eccessivo di animali da laboratorio è necessario somministrare alte dosi (potere statistico del dato)

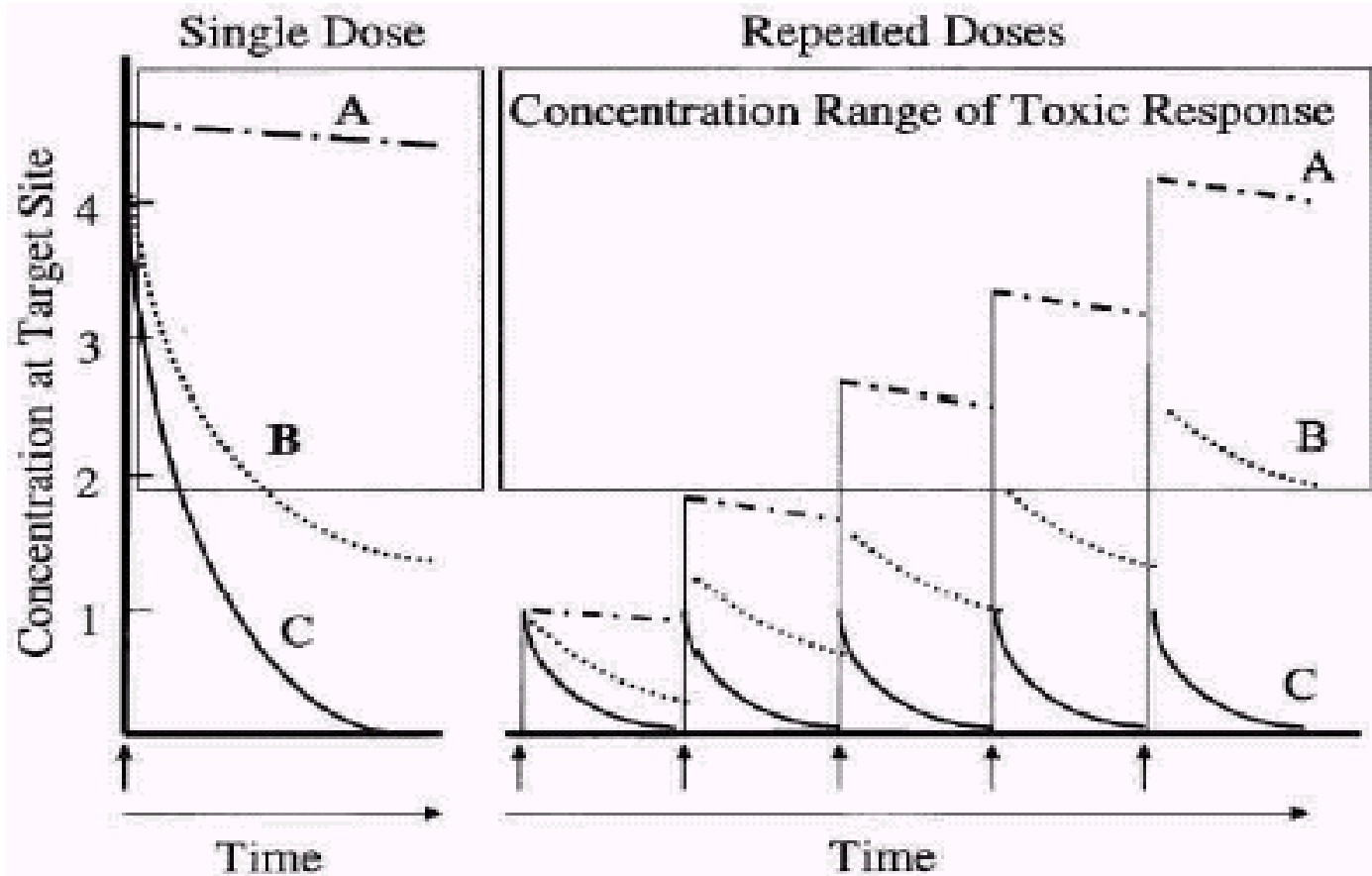
## Durata e frequenza dell'esposizione

La tossicità di una determinata dose aumenta all'aumentare della durata e della frequenza dell'esposizione, a causa di due fenomeni:

1. accumulo del tossico nell'organismo  $\Rightarrow$  la frequenza di somministrazione è maggiore della velocità di eliminazione  $\Rightarrow$  la concentrazione dello xenobiotico supera la soglia di tossicità (necessità di conoscere i dati tossicocinetici)

## Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH

Relationship between dose and concentration at the target site under different conditions of dose frequency and elimination rate



2. accumulo del danno  $\Rightarrow$  la velocità di somministrazione è maggiore della velocità di riparazione del danno da parte dell'organismo.

Si può avere accumulo del danno anche senza accumulo del tossico  $\Rightarrow$  il tempo di recupero del danno è spesso maggiore del tempo necessario all'eliminazione del tossico dall'organismo.

Es: la somministrazione di etanolo causa deposito di lipidi nel fegato (steatosi); il tempo necessario per la scomparsa dei depositi lipidici è molto più lungo di quello necessario all'eliminazione dell'etanolo  $\Rightarrow$  comparsa di effetti cronici (cirrosi)

### 3. VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE

Quale è il livello di esposizione?

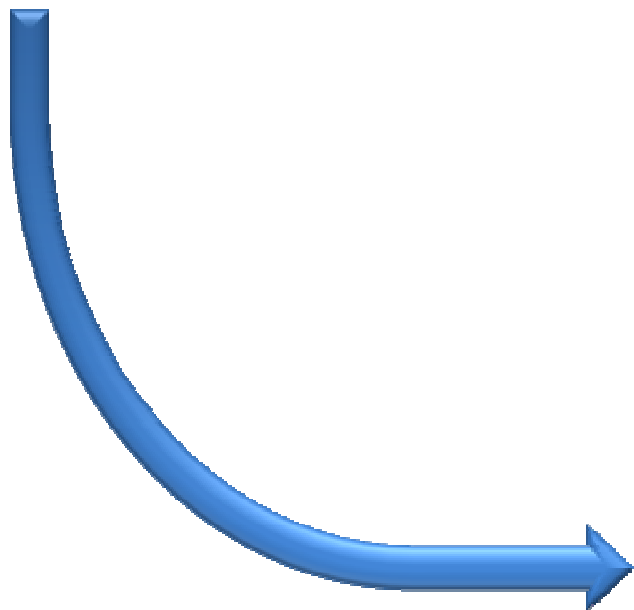
- **esterna**  A quale concentrazione una data sostanza è presente nei vari comparti ambientali/ dieta/aria /ambienti lavorativi/in prodotti ad uso voluttuario?

Attraverso quali vie l'uomo è esposto? (inalatoria, cutanea, orale..)

In quali situazioni ? lavoro, ambiente, stili di vita, alimentazione..

A quale sostanza si è esposti? (ad es., possono essere rilevanti i prodotti di degradazione ambientale)

**Interna** → Quale è la concentrazione della 'specie chimica' tossicologicamente rilevante?



ADME (% di assorbimento cutaneo/orale)  
Biomarcatori di esposizione  
Studi di biomonitoraggio e misura del 'body-burden'

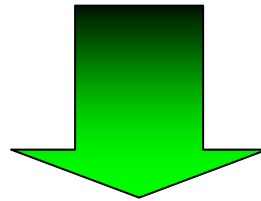


## Parametri essenziali da derivare

- % Assorbimento per via orale
- % Assorbimento per via cutanea (se non disponibile si usano valori di default 10 e 100%)
- % Assorbimento per via inalatoria (se non disponibile route to route extrapolation)
- Potenziale di bioaccumulo

## 4. CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

Che previsione può essere fatta in merito alla frequenza e alla severità degli effetti nella popolazione esposta?



Le informazioni sulla relazione dose-risposta sono combinate con le informazioni sulla entità della esposizione per produrre una stima della probabilità di osservare l'effetto tossico nella popolazione

### Fattori di variabilità:

Esposizione (durata, dose, via di esposizione): Quale popolazione e' **più esposta** ?

Suscettibilità (età, stati pato/fisiologici, fattori genetici e/o acquisiti):

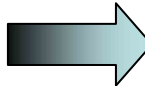
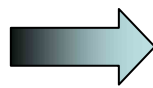
Quale popolazione è **più suscettibile**, indipendentemente dai livelli di esposizione?

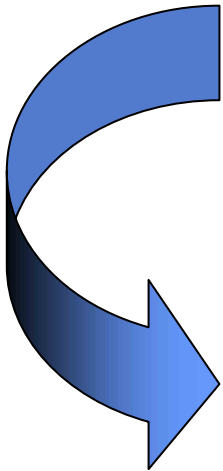
Se, attraverso la valutazione del rischio proteggerò questa/e popolazione/i proteggerò anche la popolazione generale

## Fattori di incertezza:

del dato sperimentale (qualità degli studi disponibili)

adeguatezza del modello sperimentale (specie animale rilevante, durata dello studio)

della estrapolazione dei dati animali  uomo e  
alte dosi sperimentali  basse dosi reali



Introduzione di Assessment Factors per tenere conto di variabilità e incertezza nella determinazione dei DNELS

### Assessment factors

Nonostante siano date indicazioni nei vari allegati e nei RIP, la scelta di tali fattori non può essere un processo 'automatico'. La scelta dovrebbe dipendere dalla valutazione complessiva e sono scelti dall'esperto che deve giustificare le sue scelte in modo trasparente sulla base di '**expert judgement**'

Gli AF (come in genere i valori di default) non sono sempre basati su solide basi scientifiche e quindi è necessario considerare i dati sperimentali ogniqualvolta se ne disponga. Ambiti diversi derivano diversamente gli AF.

## Valori di riferimento

### **RICHIO CRONICO**

ADI/TDI= dose giornaliera accettabile/tollerabile= dose che può essere ingerita ogni giorno per tutto l'arco della vita senza avere alcun rischio apprezzabile per la salute.

OLD

### **NEL REACH :**

**DNEL= Derived No Effect Level** (rischio cronico, subcronico, o acuto) si definisce per le sostanze che agiscono con un meccanismo a soglia

**DMEL= Derived Minimal Effect Level** (rischio cronico per le sostanze che agiscono senza una soglia –genotossici).

Il DMEL non è equivalente al DNEL. Il DMEL esprime un livello di esposizione corrispondente ad un rischio basso(a volte solo teorico)

## Derivazione del DNEL

NOAEL più basso rilevante

**AF**= variabile in dipendenza dei fattori di variabilità, incertezza, severità/rilevanza degli effetti osservati.

$$\text{DNEL} = \frac{\text{NO(A)EL}}{\text{AF}}$$

**DNEL**= livello di esposizione al di sotto del quale si assume che gli effetti avversi abbiano una probabilità tendente a zero di manifestarsi nelle popolazioni esposte

## Risk Assessment Procedure

Relevant data on critical effect occurrence



NOAEL human

NOAEL animal

No/low  
Assessment  
Factor (AF)

Interspecific Variability  
AF=10?( TK:4 x TD: 2.5)

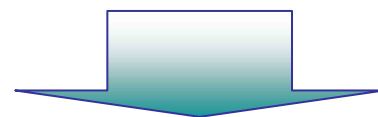
Extrapolation  
Animal /human



**Interspecific Variability**  
**UF=10**

+

**Intraspecific Variability =**  
**differences among**  
**individuals UF=10**



**UF/AF 10x10 =100**

**Quality of Data / Lack of chronic**  
**toxicity data/Type of effect UF=2-30**



**Total UF/AF : 200-3000**

## L'uso degli human data (HD) per la derivazione del DNEL

Il testing su volontari è fortemente scoraggiato, ma quando dati di **buona qualità** siano già disponibili devono essere considerati

Workshop a Novembre 2007 (ECETOC/TNO) e discussione delle Competent Authorities su RIPs 3.2 and 3.3 (adozione di 3.2/3.3 TGD a Marzo 2008).

**Preparazione di un documento attualmente in elaborazione (adozione prevista inizi del 2009)**

## Preparazione di un documento attualmente in elaborazione

- Valutazione della **qualità degli HD** (categorizzazione simile a quella utilizzata per gli studi sugli animali) documenti WHO e ECETOC;
- **Confronto tra HD e AD** e identificazione dei più adeguati alla derivazione del DNEL (or DMEL) basato sui principi espressi dall'IPCS per la rilevanza dei dati e non esclusivamente su WoE;
- **Proposta per un set di AF** appropriati per HD

La **qualità** degli HD dipende da:

- La qualità dello study design.
- La qualità delle informazioni del livello di esposizione.
- La qualità dei dati relativi agli effetti .
- La qualità e la possibilità di generalizzare le conclusioni .

### **Uso di AF con gli HD:**

- differenze intraspecifiche (n° degli individui, presenza di sub-popolazioni);
- differenze nella via di esposizione e nella durata;
- andamento della relazione dose-risposta;
- qualità del database di HD

HD di buona qualità e rilevanti (**reliable and relevant**) hanno la precedenza su altri dati.

### MA

La mancanza di risultati positivi sull'uomo (es. dati di irritazione/corrosione) non ha la precedenza rispetto a dati positivi di buona qualità ottenuti in studi su animali (**no overrule**)

Se sono disponibili HD di tossicità ripetuta difficilmente il livello di esposizione è definito, i fattori confondenti esclusi e il numero di individui sufficiente. In questa situazione non è opportuno derivare i DNEL da HD ma utilizzarli come **supporting information**

L'evoluzione delle tecniche di biomonitoraggio e di epidemiologia molecolare dovrebbe migliorare l'interpretazione e il disegno di studi epidemiologici.

**HD negativi non cancellano dati positivi ottenuti su animali** a meno che studi e dati solidi su meccanismo di azione non dimostrino che la risposta è specie-specifica e non rilevante nell'uomo (ma questo vale anche in assenza di HD).

# Il rischio delle sostanze chimiche e il regolamento REACH

		Quality of human data				
		I	II	III	IV	X
Quality and relevance of animal data	I					
	II					
	III					
	IV	<b>Human data take precedence</b>				
	X					

Animal data take precedence

Human data take precedence



I dati positivi hanno la precedenza sia che siano HD o AD, a meno che ci siano evidenze specifiche ad indicare specie-specificità.

### Rischio Acuto

- NOEL acuto più basso = la dose più alta alla quale non si osservano effetti dopo singola esposizione
- Non facilmente disponibili (di solito l'endpoint studiato è la mortalità).
- AF da applicare; variabilità inter- and intra-species uso del LOEL invece del NOEL, qualità dei dati).
- Eventuali fattori di correzione (CF) da introdurre per la diversa via di somministrazione (basato su dati TK).

$$\text{Dose acuta senza effetto} = \frac{\text{NOEL} \times \text{bw} \times \text{CF}}{\text{AF}}$$



## RISCHIO SUB-CRONICO

- Esposizione giornaliera per un periodo di tempo limitato
- NOEL subcronico, con applicazione degli AF

$$\text{Rischio subcronico} = \frac{\text{NO(A)EL}}{\text{AF}}$$