

Vecchie e nuove sfide nella valutazione del rischio tossicologico

Corrado L. Galli

Università degli Studi di Milano, Past President SITOX

VECCHIE E NUOVE SFIDE NELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO

Analisi dei parametri fondamentali per la valutazione del rischio: dose, effetto e soglia

La Scienza studia e cerca di interpretare i fenomeni che avvengono in natura. Spesso noi osserviamo il trascorrere degli avvenimenti senza comprenderne a fondo le cause che sottintendono tali eventi. Ad esempio, ci siamo mai chiesti quali sia il movente del fenomeno legato alla discesa di una elevata temperatura corporea?

I fenomeni indotti dall'uomo o dalla natura possono essere di due tipi: fenomeni fisici e fenomeni chimici (cause), che sono alla base dei fenomeni biologici (effetti); in questo lavoro vedremo quali collegamenti esistono tra le diverse tipologie di fenomeni descritti e la necessità che i fenomeni suddetti concorrano a sviluppare una certa energia (soglia) al fine di ottenere una risposta biologica che può risultare benefica, avversa o addirittura tossica.

Un fenomeno fisico avviene quando la ma-

teria che forma un corpo, una molecola, un farmaco o un composto tossico non si trasforma ma cambia il suo stato di aggregazione, la sua reattività. Un fenomeno chimico avviene quando la materia che forma un corpo si trasforma, cioè cambia, esprimendo proprietà diverse.

Vi sono infine dei fenomeni che avvengono solamente negli esseri viventi, vegetali e animali; sono i fenomeni biologici (dalla parola greca bios che significa vita), la nascita, la crescita, l'assimilazione degli alimenti, la sensibilità e la suscettibilità individuale, le patologie, sono tipici fenomeni biologici.

I processi vitali sono regolati dagli stessi principi generali che governano i fenomeni fisici; infatti, la termodinamica, per esempio, che non dà informazioni sui meccanismi molecolari o sulla velocità con cui una trasformazione avviene, studia le leggi con cui i sistemi scambiano energia sotto forma di calore o lavoro e come risulta essere

parte integrante dei sistemi biologici. Ogni volta che un sistema riceve o cede energia in funzione di una causa naturale o provocata (dose) e passa da uno stato di equilibrio ad un altro per la tendenza delle molecole a raggiungere uno stato di maggior dispersione dell'energia e non di minima energia, è in grado di produrre un effetto biologico. L'energia immagazzinata sotto forma di energia interna può essere successivamente riutilizzata mediante interazione, per esempio, con molecole bersaglio.

Perché si abbia una variazione dell'energia interna (es. energia dovuta ai legami fra nucleo e elettroni o fra atomi) di un sistema, è necessario che questo non sia isolato ma possa scambiare energia con l'esterno, per esempio dando esito a reazioni chimiche che possono avvenire mediante il trasferimento di frammenti molecolari e il comporsi di nuove specie molecolari. Una reazione chimica può procedere spontaneamente in una certa direzione piuttosto che in un'altra (l'arrugginimento di un pezzo di ferro in presenza di ossigeno, la combustione del metano nell'impianto di riscaldamento, l'imbrunimento di una fetta di mela lasciata all'aria, l'irrancidimento del latte conservato troppo a lungo) e può essere mediata da elementi che ne favoriscono e ne accelerano la trasformazione (metalli, enzimi).

La chimica è fondamentale per la comprensione dei processi molecolari che si verificano all'interno delle cellule e per la conoscenza della struttura e reattività delle molecole biologiche fondamentali alla vita quali le proteine, gli acidi nucleici, i carboidrati ed i lipidi.

La chimica fornisce la base teorica e pratica della biologia, poiché i processi biologici sono basati su reazioni chimiche.

La chimica e la biologia sono dunque strettamente correlate e costituiscono le basi

della identificazione del valore energetico oltre al quale (soglia) si verifica un dato fenomeno biologico (risposta).

Fondamentale è stata la rivoluzione in campo della risposta biologica del medico svizzero Paracelso nato Theophrastus von Hohenheim (1493 - 1541), che estese il suo interesse per la chimica e la biologia a quelle che oggi sono considerate le scienze tossicologiche. Paracelso fu uno dei primi scienziati europei a introdurre la chimica in medicina. Per la prima volta egli espose chiaramente il concetto di dose-risposta «*Omnia venenum sunt: nec sine veneno quicquam existit. Dosis sola facit, ut venenum non fit*» (Tutto è veleno: nulla esiste di non velenoso. Solo la dose fa in modo che il veleno non faccia effetto). Paracelso enunciò tale paradigma per difendere il suo uso originale di sostanze inorganiche ad uso terapeutico in medicina, criticato poiché considerate tossiche per essere usate in terapia. La sua convinzione che le malattie si localizzassero in un organo specifico fu estesa all'inclusione del concetto della tossicità in un particolare organo bersaglio; cioè esiste un sito specifico nel corpo in cui una sostanza chimica eserciterà il suo massimo effetto.

Sulla base del principio enunciato da Paracelso le Scienze tossicologiche odierne studiano da un punto di vista qualitativo e quantitativo la casualità degli effetti avversi dovuti all'interazione tra un organismo vivente e qualsiasi sostanza in grado di modificarne lo stato di benessere attraverso un'alterazione dannosa di processi biochimici dei suoi organi.

Il principio enunciato da Paracelso è oggi alla base della caratterizzazione del rischio cioè la importanza fondamentale della "dose": una quantità misurata di una sostanza o di un agente potenzialmente tossico che viene erogata come unità. Maggiore è la quantità erogata, maggiore è la dose. Tale concetto può essere utilizzato

per descrivere qualsiasi caso in cui una sostanza estranea venga introdotta nell'organismo. Nella scienza della nutrizione, il termine viene solitamente applicato alla quantità di un nutriente specifico presente nella dieta o in un particolare alimento, pasto o integratore alimentare. Per gli agenti tossici la dose si riferisce alla quantità minima di sostanza necessaria ad intossicare l'ospite.

Uno degli obiettivi principali che si pone il tossicologo è la valutazione del pericolo e del rischio tossicologico -concetti diversi e non sovrapponibili- che assieme alla sua gestione e comunicazione fa parte di un processo complesso chiamato "analisi del rischio".

La analisi del rischio tossicologico si articola in 4 fasi:

1. Identificazione del pericolo (Che tipo di effetti avversi induce la sostanza?)
2. Valutazione del pericolo (A che livello di esposizione -dose- si osserva un determinato effetto avverso?)
3. Quantificazione dell'esposizione in base

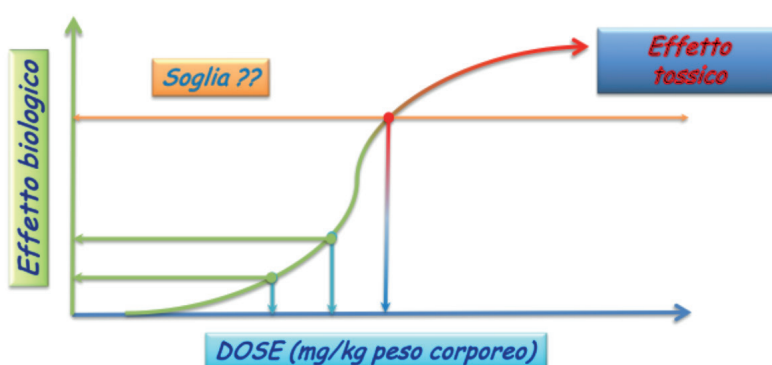
alla determinazione di una curva esposizione (dose)/ effetto (risposta biologica) (Qual è il livello di esposizione a cui si possono definire le soglie di non effetto, NOAE e BMD, oppure gli effetti avversi/tossici e, conseguentemente, calcolo delle dosi ritenute sicure per la popolazione, DGA o ADI, DGT o TDI ecc.? Per quali vie? In quali organi?)

4. Caratterizzazione del rischio (In base alla dose di esposizione che previsione può essere fatta in merito alla frequenza e alla severità degli effetti nella popolazione esposta?)

È essenziale subito sottolineare la differenza tra pericolo e rischio. Il pericolo è una caratteristica intrinseca della sostanza. Il rischio è invece la probabilità di andare incontro a effetti avversi che la sostanza può provocare in seguito ad esposizione al di sopra di una determinata dose denominata soglia (threshold).

La valutazione del pericolo riflette l'aspetto quantitativo e comporta la quantificazione dell'effetto avverso (identificazione del pericolo) in base ad una relazione dose-risposta.

CURVA DOSE - RISPOSTA



L'identificazione degli effetti avversi indotti da una sostanza in esame (pericolo intrinseco) si basa sulla raccolta ed analisi di una varietà di studi tossicologici che comprendono nuovi approcci metodologici (NAM)

integrati (IATA) che vanno dai modelli *in chimico* (misura della reattività chimica), *in silico* (misure predittive basate su modelli computazionali), di *read-across* (prevedere le informazioni del bersaglio tossi-

co di una sostanza utilizzando i dati dello stesso bersaglio tossico di altre sostanze di cui sono note le informazioni riguardanti le sue proprietà tossiche), *in vitro* (colture cellulari, frazioni subcellulari, enzimi purifi-

cati), *in vivo* (animali da laboratorio) e dalle osservazioni sull'uomo (dati scientifici epidemiologici e clinici) che vengono denominate linee di evidenza.

Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)

può includere

- ❖ *in vitro*, colture cellulari, frazioni subcellulari, enzimi purificati
- ❖ *ex vivo*, da animali da laboratorio
- ❖ *in chemico* (misura della reattività chimica),
- ❖ *in silico* (misure predittive basate su modelli computazionali),
- ❖ *read-across*, prevedere le informazioni del bersaglio tossico di una sostanza utilizzando i dati dello stesso bersaglio tossico di altre sostanze di cui sono note le informazioni riguardanti le sue proprietà tossiche,
- ❖ nonché combinazioni di questi per eseguire l'estrapolazione *in vitro* - *in vivo* (IVIVE)

LINEE DI EVIDENZA



Gli studi tossicologici includono anche una serie di sperimentazioni volte a identificare il destino metabolico della sostanza in esame dall'introduzione all'escrezione in un organismo vivente (tossicocinetica) e il suo meccanismo d'azione (tossicodinamica).

La esposizione a qualsiasi agente chimico o biologico sottintende diversi fattori critici perché esprima una attività: la dose, cioè la quantità di agente che viene somministrata, la durata dell'esposizione, il metabolismo e la via di somministrazione.

La caratterizzazione del rischio è la fase finale della valutazione del rischio e consiste nel confrontare le informazioni ricavate

dall'identificazione e valutazione del pericolo con quelle sull'entità dell'esposizione umana al fine di simulare una stima della probabilità di osservare un effetto tossico nella popolazione che può emergere dal superamento di soglie (dosi) definite sicure dagli esperti tossicologi che compongono i vari comitati scientifici attivi nelle varie Agenzie Internazionali.

La valutazione dell'esposizione rappresenta una tappa fondamentale nella caratterizzazione del rischio in quanto in assenza di esposizione il rischio tende a zero.

Questa fase rappresenta senza dubbio un momento delicato del processo della ca-

ratterizzazione del rischio. Il tossicologo deve tener conto di diversi i fattori che possono modulare l'esposizione come la durata, la frequenza, la via e la velocità di assorbimento, il polimorfismo genetico, la sensibilità di diversi gruppi di popolazione (bambini, donne in gravidanza, anziani...) e i fattori ambientali. Inoltre, va ricordato

che la disponibilità di dati e informazioni relativi all'esposizione è spesso limitata. In questi casi quando non si hanno informazioni derivati dal monitoraggio biologico o da misurazioni dirette di esposizione, si ricorre a calcoli deterministici o probabilistici per ottenere una stima plausibile di esposizione nella popolazione.



Durante la valutazione del livello di esposizione, vanno considerate sia l'esposizione esterna che quella interna. Per valutare il livello di esposizione esterna (dose esterna) bisogna individuare sperimentalmente a quale concentrazione una data sostanza è presente nei vari comparti ambientali, nella dieta, nell'aria e negli ambienti lavorativi. Inoltre, vanno studiate le principali vie di esposizione (orale, inalatoria e cutanea) e in quali situazioni (lavoro, alimentazione, ambiente, stile di vita ecc.) avviene il contatto.

Per valutare invece il livello di esposizione interna (dose interna) bisogna determinare la concentrazione della sostanza e/o dei suoi prodotti di trasformazione nei vari distretti corporei e nel sito di azione e, naturalmente, il destino della sostanza all'interno dell'organismo.

La valutazione del pericolo di solito si traduce nel calcolo di dosi ammissibili per la salvaguardia della popolazione (soglie), ad esempio una dose giornaliera ammissibile (DGA o ADI: dose espressa in mg/kg

di peso corporeo, che può essere assunta giornalmente da un individuo adulto anche per tutto l'arco della vita senza rischio apprezzabile per la salute). Invece, per tutte quelle sostanze presenti nei prodotti alimentari che non sono state aggiunte intenzionalmente (contaminanti), i valutatori del rischio definiscono una dose giornaliera tollerabile (DGT o TDI).

L'identificazione dell'effetto avverso e a quale dose si manifesta, è senza dubbio una tappa essenziale e imprescindibile nella valutazione del pericolo.

È fondamentale sottolineare che la caratterizzazione del rischio valutata solo sulla base del pericolo risulta fuorviante e può indurre reazioni sproporzionate e inutili allarmismi nella popolazione.

Al fine di calcolare le dosi sicure per la popolazione infine bisogna identificare una dose che non è in grado di provocare alcun effetto avverso. A tale fine necessiterebbe selezionare una dose pertinente all'interno della curva dose-risposta tossicologica (la dose-soglia - threshold) definita come il li-

vello di dose oltre alla quale si può evidenziare un effetto tossico, dose denominata anche punto di partenza (Point of Departure) al fine di calcolare gli Health Based Guidance Values (HBGVs), dosi ricavate da conoscenze scientifiche che definiscono l'esposizione massima (orale) a una sostanza che non si prevede possa comportare un rischio apprezzabile per la salute per la popolazione, tenendo presente anche la probabile durata del consumo. La conoscenza della relazione dose-risposta è fondamentale per stabilire la relazione di causalità tra l'effetto osservato e il composto chimico a cui è avvenuta l'esposizione e definire la dose più bassa a cui si è osservato l'effetto. Per la maggior parte degli effetti tossici si può identificare, almeno sperimentalmente, una dose-soglia al di sotto della quale non si misura alcun effetto nelle condizioni sperimentali utilizzate. L'effetto ricercato è una risposta dell'organismo a uno stimolo esterno (esposizione).

Mentre per gli effetti cancerogeni non mediati da effetti genotossici si ammette una soglia (PoD), nel modello di cancerogeni genotossici non è riconosciuta, da un punto di vista regolatorio, una dose-soglia e perciò un PoD. L'evento iniziale, sostenuto dalla mutazione è un danno che da solo è in grado di innescare eventi successivi o di predisporre all'insorgenza di eventi che, se non riparati, possono risultare in un tumore o in un'altra patologia cronico-degenerativa.

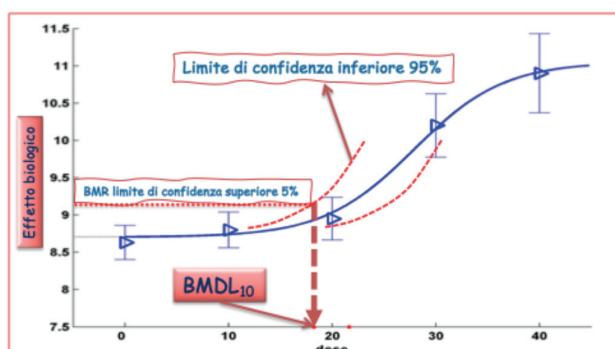
Tradizionalmente, quando i dati sperimentali sugli animali vengono utilizzati per la valutazione del rischio di sostanze negli alimenti che non sono genotossiche e cancerogene, il livello senza effetti avversi osservati (NOAEL) e/o il livello più basso di effetti avversi osservati (LOAEL) per l'effetto critico di una sostanza, costituiscono il PoD per ricavare valori guida per la salvaguardia della salute della popolazione, come la dose giornaliera accettabile (ADI).

Laddove siano disponibili dati in vivo utilizzabili, il metodo preferito e raccomandato negli ultimi anni dai maggiori enti regolatori internazionali, sia per sostanze con soglia che senza soglia, è quello di utilizzare l'approccio Benchmark Dose o Dose di riferimento (BMD) per ricavare la PoD come punto di partenza per la valutazione del rischio per la salute umana.

Nella modellazione BMD, la relazione dose-risposta segue una tendenza crescente o monotona. Ciò significa che maggiore è l'esposizione a un composto pericoloso, maggiore è la probabilità che si verifichi un effetto (per effetti probabilistici) o la gravità dell'effetto (per effetti deterministici).

L'approccio BMD si avvale di tutti i dati dose-risposta per stimare l'andamento della relazione dose-risposta complessiva per un particolare endpoint ed è applicabile a tutte le sostanze chimiche.

BENCHMARK DOSE - (BMD)



Tra le nuove proposte per la prioritizzazione del rischio è disponibile lo strumento del Threshold of Toxicological Concern (TTC), sempre più utilizzato per selezionare e dare priorità alle sostanze con bassa esposizione; lo stesso sta ricevendo un consenso sempre più ampio da parte degli enti regolatori. Il TTC è uno strumento pragmatico di valutazione del rischio che si basa sul principio di stabilire un valore soglia giornaliero di esposizione umana per tutte le sostanze chimiche al di sotto del quale vi è una probabilità molto bassa di un rischio apprezzabile per la salute umana. L'approccio mira a selezionare e dare priorità ai composti chimici, presenti in quantità molto piccole, per i quali sono noti la struttura chimica e i dati di esposizione, ma per i quali non sono disponibili dati sulla tossicità o sono disponibili dati limitati.

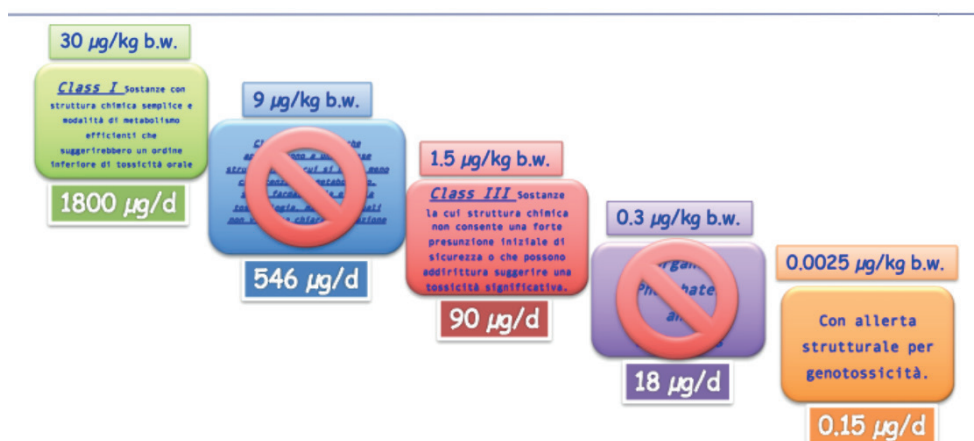
I valori TTC in uso sono stati derivati dall'analisi di ampi database di studi tossicologi-

ci su animali; le informazioni estratte sono state utilizzate per derivare soglie quantitative estremamente conservative.

La relazione tra struttura chimica e tossicità è stata esplorata attraverso la compilazione di un ampio database di riferimento costituito da sostanze cancerogene e sostanze chimiche testate per una varietà di endpoint tossicologici, da cui sono stati derivati dei PoD. Ogni sostanza nel database non genotossica e/o cancerogena è oggi classificata in una delle ormai due classi strutturali rimaste utilizzando un approccio "ad albero decisionale" che consiste in 33 domande (aggiornate a 44) a ciascuna delle quali si risponde con "sì" o "no". Ogni risposta porta a un'altra domanda o a una classificazione finale in una delle due classi.

Il valore TTC per sostanze con delle allerte strutturali per i cancerogeni genotossici (0.15 Qg/day) è ritenuto in generale sufficientemente "protettivo".

THRESHOLD OF TOXICOLOGICAL CONCERN SOGLIE



Nei prossimi articoli vedremo come sono stati sviluppati metodi alternativi (NAMs) agli esperimenti sugli animali al fine di soddisfare il principio delle 3R (replace, reduce, refine) che richiede la riduzione al minimo degli esperimenti e il loro miglioramento al fine di arrecare agli animali il minor aggravio possibile.