

# Analisi del rischio nella valutazione tossicologica

**Corrado L. Galli, Marina Marinovich**

*Sezione di Tossicologia e Valutazione del Rischio,  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti" (DiSFeB),  
Università degli Studi di Milano*

## Introduzione

L'analisi del rischio è un processo complesso che include tre fasi cruciali: valutazione e caratterizzazione del rischio, gestione del rischio e comunicazione del rischio.

La prima, la valutazione del rischio, fornisce le fondamenta scientifiche sulle quali poggia tutta l'analisi del rischio.

La valutazione del rischio include l'identificazione del pericolo e la sua valutazione, la quantificazione dell'esposizione e la caratterizzazione del rischio, come anche codificato dall'OMS (FAO/WHO 1985EUD 93/67/EEC of 20.07.1993 e (WHO/UNEP/ILO, ICPS) e 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), sulla base di standard internazionali.

Prima di discutere di identificazione di pericolo, è importante chiarire la differenza tra pericolo e rischio. Il pericolo è una caratteristica intrinseca della sostanza, il ri-

schio è invece la probabilità di andare incontro agli effetti avversi che la sostanza può provocare in seguito all'esposizione al di sopra di una determinata dose denominata soglia. L'identificazione del pericolo riflette l'aspetto qualitativo della valutazione, identificando la potenziale tossicità intrinseca dell'agente chimico, naturale o di sintesi.

- L'identificazione del pericolo consiste nell'identificazione degli effetti avversi (su base qualitativa) prodotti dalla sostanza in esame, quali, ad esempio, neurotossicità, epatotossicità, difetti nei nascituri, ecc., senza tenere in considerazione la dose o la specie nella quale si sono manifestati; è quindi l'identificazione della potenziale tossicità delle sostanze;
- La valutazione del pericolo è invece incentrata sulla quantificazione dell'effetto avverso in base ad una relazione dose-risposta. In esperimenti ben fatti la caratterizzazione del pericolo do-

vrebbe essere in grado di identificare una dose senza effetto tossico avverso, NO(A)EL (No Observed (Adverse) Level), cioè la più alta dose che non causa tossicità.

Queste due fasi derivano da appropriati esperimenti condotti su animali da laboratorio o sistemi alternativi purché convalidati.

- La quantificazione dell'esposizione è parte della valutazione del rischio ed è definita, in accordo con l'Organizzazione Mondiale della Sanità, come la valutazione quantitativa della probabile esposizione ad una sostanza chimica, tenendo in considerazione tutte le fonti rilevanti (alimenti, acqua, aria, ecc.);
- La caratterizzazione del rischio integra le informazioni derivate dalla identificazione del pericolo e dalla valutazione dell'esposizione in un suggerimento utile a fini decisionali e nel gestire il rischio.

Questa è ovviamente una semplificazione di un processo in cui entrano a far parte molti altri elementi quali fattori tossicocinetici (ADME), il meccanismo d'azione, le differenze fra specie e così via.

È, attualmente, l'unica procedura scientificamente accettata a livello internazionale, che può essere usata nella valutazione della gravità e della probabilità che un effetto avverso si verifichi in esseri umani o nell'ambiente in seguito all'esposizione in determinate condizioni ad una fonte di pericolo, come ad esempio una sostanza chimica sia essa di origine naturale che artificiale.

## Identificazione del pericolo

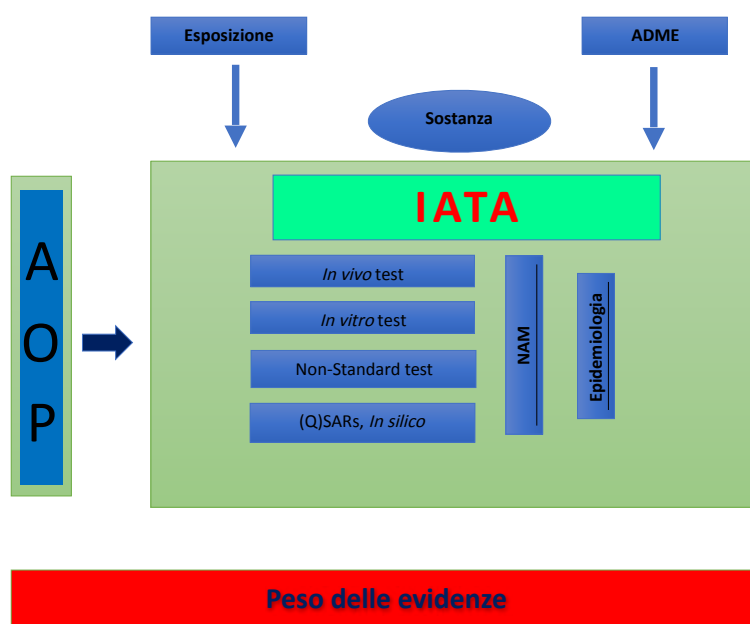
### Protocollo sperimentale

La fase di identificazione del pericolo nel XXI secolo si è arricchita di una originale raccolta di prove atte a fornire una sempre più attendibile risposta alla necessità di proteggere la salute della popolazione. L'identificazione degli effetti avversi indot-

ti da una sostanza si basa sulla raccolta ed analisi di una varietà di studi tossicologici che vanno dai modelli *in chemico* (misura delle reattività chimica), *in silico* (misure predittive basate su modelli computazionali), di *read-across* (prevedere le informazioni del bersaglio di tossicità di una sostanza utilizzando i dati di altre sostanze di cui sono note le informazioni riguardanti le proprietà tossiche), *in vitro* (colture cellulari, frazioni subcellulari, enzimi purificati), *in vivo* (animali da laboratorio) e dalle osservazioni sull'uomo (dati epidemiologici e clinici). Questi elementi nell'insieme vengono definiti come Nuovi Approcci Metodologici (NAM). I notevoli progressi nelle biotecnologie, nella microingegneria, microfluidica, informatica, nella potenza di calcolo e nella cooperazione multidisciplinare, hanno consentito lo sviluppo di NAM (Nuovi Approcci Metodologici), inaccessibili solo fino a pochi anni fa. Sebbene si tratti di un campo relativamente nuovo, nato con l'emergere del cambio di paradigma della Tossicologia del XXI secolo, vale a dire la necessità di porre in pratica il principio delle 3R (rimpiazzare, ridurre e (r)affinare) l'uso degli animali con tecniche alternative cioè appunto con Nuovi Approcci Metodologici, i NAM permettono già oggi di studiare le condizioni e le malattie umane in un'ottica *human-based*, cioè incentrata sulla biologia umana ed in condizioni fisiologicamente rilevanti, svolgendo un ruolo importante nella ricerca tossicologica e biomedica. *NAM human-based* permettono, da una parte, lo sviluppo di farmaci e vaccini più sicuri, lo studio dei meccanismi di tossicità e sono efficaci per la specie umana e, dall'altra, il superamento della sperimentazione animale. Alcuni NAM si sono già dimostrati migliori dei modelli animali nel predire le risposte umane. Le informazioni scientifiche così raccolte verranno valutate con un approccio integrato, quale l'*Integrated Approaches to Testing and Assessment* (IATA).

Le risultanze dell'approccio integrato insieme ai dati riguardanti la valutazione del meccanismo di azione, *Adverse Outcome Pathway* (AOP) - un percorso tossicologico tra un evento molecolare iniziale ed "eventi chiave" causalmente collegati che si verificano a diversi livelli dell'organizzazione biologica, fino ad un effetto avverso per l'individuo o per la popolazione -, con l'aggiunta delle informazioni riguardanti le proprietà tossicocinetiche (ADME), genereranno il peso delle evidenze relative a una decisione valutate in base alla loro solidità e qualità. Questo approccio è vantaggioso quando le informazioni provenienti da un singolo elemento di prova da sole non sono sufficienti per dimostrare una plausibile attività biologica. Il peso da attribuire alle prove disponibili dipende da fattori quali la qualità dei dati, la coerenza dei risultati, la natura e la gravità degli effetti e la pertinenza delle informazioni. L'identificazione del pericolo costituito da un agente chimico necessita dell'esecuzione di una complessa batteria di sperimentazioni tossicologiche *in vivo* ancora oggi ritenuti essenziali, al fine di studiare effetti tossici di derivazione complessa quali quelli tumorali, immunologici e relativi alla

riproduzione che necessitano dello studio delle proprietà tossicocinetiche e tossicodinamiche della sostanza in esame al fine di conoscere gli aspetti quali-quantitativi legati all'assorbimento, al potenziale di bioaccumulo, alla distribuzione nei tessuti dell'organismo ospite, al metabolismo ed, infine, ai fattori legati alla sua eliminazione attraverso gli escreti (es. urine, feci, sudore, espirato, latte). Le prove proseguono con lo studio della tossicità acuta della molecola: la dose letale per via orale per via cutanea ( $DL_{50}$ ), per via inalatoria ( $LC_{50}$ ) ed il potenziale irritante cutaneo, oculare e di sensibilizzazione cutanea. Gli effetti genotossici sono studiati al fine di chiarire il potenziale della sostanza di interagire con il materiale genetico cellulare provocando effetti mutageni, clastogeni o di aneuploidia. Vengono compiute poi prove di tossicità che prevedono la somministrazione giornaliera della sostanza per quattro o tredici settimane in diverse specie ed eventualmente per un anno nel cane. Vengono condotti contemporaneamente degli esperimenti di tossicità dello sviluppo (teratogenesi) e altri, su più generazioni, per comprendere se la sostanza interferisce con il sistema riproduttivo degli animali e



sulla fertilità.

Le prove *in vivo* più rilevanti tossicologicamente sono senza dubbio quelle di cancerogenesi e/o di lungo termine compiute somministrando la sostanza in esame, giornalmente, per la maggior parte della vita dell'animale da esperimento utilizzato, cioè circa due anni per i roditori (18 mesi per il topo e 24 mesi per il ratto); la scelta di condurre esperimenti così gravosi deriva dal fatto che i risultati, ottenuti applicando la regola del “caso peggiore” (cioè più punitivo per la molecola ma precauzionale per l'individuo), sono in grado fornire delle basi ottimali per poter estrapolare all'uomo il rischio derivante dal contatto con la sostanza in esame anche per tutto l'arco della vita.

### Valutazione del pericolo

#### **Dose Giornaliera Ammissibile (DGA o ADI) e NO(A)EL**

Per molte sostanze appartenenti a gruppi specifici (residui di pesticidi negli alimenti, contaminanti e additivi alimentari, ecc...) per cui è prevista un'esposizione della popolazione per via orale, è necessario fissare limiti di sicurezza, indicare, cioè, delle soglie prudenziali da non superare.

La valutazione del pericolo viene compiuta applicando una semplice formula

$$DGA (ADI) = \frac{NO(A)EL}{SF(UF)}$$

Ove:

DGA = (Dose Giornaliera Ammissibile o ADI, *Acceptable Daily Intake*) è la dose, espressa in mg/kg di peso corporeo, che può essere assunta giornalmente da un individuo adulto del peso medio di 60 kg anche per tutto l'arco della vita senza rischio apprezzabile per la salute allo stato delle conoscenze attuali;

NO(A)EL = (*No Observed (Adverse) Effect Level* o Dose a cui non si osserva alcun effetto avverso) la più elevata concentra-

zione o quantità di una sostanza, espressa in mg/kg di peso corporeo, derivante da studi sperimentali, preferibilmente a lungo termine, o osservazioni epidemiologiche, che non causa effetti tossici (avversi), alterazioni morfologiche o funzionali, modificazioni della crescita corporea, dello sviluppo e della durata della vita del soggetto sperimentale in studio.

SF = (*Safety Factor* o Fattore di Sicurezza; secondo una più recente denominazione UF, *uncertainty factor*, fattore di incertezza), è il fattore utilizzato per trasformare il NO(A)EL in ADI, per estrapolare cioè i risultati ottenuti nell'animale alla popolazione umana; è variabile (10, 100, 1000...) e dipende dalla natura dell'effetto tossico, dalla tipologia di popolazione a rischio esposta e dalla qualità delle informazioni tossicologiche disponibili al momento della decisione. Il Fattore di sicurezza può essere ridotto a 10 quando si hanno a disposizione dati derivanti da osservazioni compiute sulla popolazione umana o innalzato a 1000 quando il protocollo sperimentale utilizzato nell'animale ha previsto tempi ridotti (es. trattamento per soli 90 giorni). La maggior parte delle volte al NO(A)EL viene applicato un fattore di incertezza di 100 (10x10), che tiene quindi conto della variabilità di risposta all'interno della popolazione.

La determinazione del NO(A)EL, che ricordiamo è un valore OSSERVATO e non calcolato o estrapolato, dipende prima di tutto dalla scelta opportuna dei dosaggi nell'esperimento condotto nell'animale, in modo tale che la dose più alta produca un effetto dannoso che non deve essere osservato alla dose più bassa. Vengono usati almeno tre dosaggi, in aggiunta al gruppo controllo non trattato, per determinare la correlazione dose-effetto. Conoscendo la natura della risposta alla dose più alta di una determinata sostanza, si può valutare in modo più sicuro il NO(A)EL ai dosaggi

più bassi concentrandosi più a fondo su particolari organi bersaglio.

Studi a 4 o 13 settimane sono a volte sufficienti per definire il livello di sicurezza, ad esempio con sostanze simili per identità chimica a molecole già approvate per l'uso di cui è nota la bassa tossicità. In questo caso il fattore di sicurezza può essere superiore a 100.

### **Valutazione della rilevanza degli effetti tossici per la specie umana**

L'identificazione di un effetto dannoso in uno studio specifico dipende dalle dosi utilizzate, dal tipo di parametri misurati e dalla capacità di distinguere tra effetti veramente dannosi e falsi positivi. Ad esempio, se si osserva soltanto una leggera modifica in un particolare parametro al dosaggio intermedio, ma non agli altri dosaggi, diventa difficile distinguere tra un effetto veramente dannoso e un dato accidentalmente positivo, non essendoci una correlazione dose-risposta. Inoltre, la riduzione dell'aumento del peso corporeo collegata con un diminuito consumo di cibo è difficilmente interpretabile come effetto dannoso, perché la gradevolezza del cibo potrebbe essere influenzata dalla presenza di elevati livelli della sostanza in esame caratterizzata da proprietà organolettiche spiacevoli. Ancora, una diminuzione ponderale dose-risposta è frequentemente usata per stabilire un livello di effetto in assenza di altre manifestazioni tossiche.

Quando vengono compiuti studi su diverse specie animali, i NO(A)EL sono calcolati per ciascuno studio. Il NO(A)EL usato per calcolare il valore di ADI sarà il *no-observed-(adverse)-effect level* risultante dallo studio sull'animale che ha evidenziato un effetto tossico alla dose più bassa e nella specie più sensibile. Questo approccio è ragionevole quando gli studi sugli animali sono di durata simile (in relazione alla vita attesa della specie considerata) e di qualità simile, e non sono disponibili altri dati.

Tuttavia, se la qualità di un risultato è chiaramente superiore a quello di un altro e/o gli studi differiscono tra di loro per quanto riguarda la durata (lungo termine rispetto a breve termine), ai fini della scelta del NO(A)EL bisogna dare maggior peso agli studi con maggiore durata e qualità. Se sono disponibili dati metabolici e farmacocinetici, le specie più simili all'uomo, individuate da precedenti risultati sperimentali basati su studi del meccanismo di azione relativamente agli effetti tossici, devono essere preferite a quelle più sensibili nel calcolo dei NO(A)EL.

Quando si analizza uno studio tossicologico e si definisce il NO(A)EL, occorre distinguere tra cambiamenti reversibili, legati a fenomeni di adattamento o a meccanismi di mantenimento dell'omeostasi, e risposte propriamente tossiche. Tra gli esempi del primo tipo di risposta possiamo citare: effetti lassativi da sovraccarico osmotico, ipertrofia epatica e induzione enzimatica microsomiale derivanti da alti dosaggi di sostanze metabolizzate dal fegato, riduzione dell'incremento ponderale o ingrossamento dell'intestino cieco derivanti da elevati livelli di sostanze non nutritive, alterazione del peso del rene direttamente collegata alla quantità d'acqua filtrata dal rene stesso e, infine, rallentamento della crescita e del consumo alimentare collegati alla somministrazione nella dieta di una sostanza non gradevole al palato. Tuttavia, occorre fare attenzione nell'interpretazione di questi cambiamenti, che non devono automaticamente essere scartati come privi di importanza da un punto di vista tossicologico. Un rallentamento della crescita del peso corporeo collegato ad una corrispondente riduzione del consumo di cibo potrebbe essere dovuto ad anoressia tossica, invece che ad una scarsa gradevolezza al palato della sostanza in esame.

Una volta completata la miglior stima della dose, si valuta il rapporto tra questa dose e l'effetto riscontrato. Per molte caratteristi-

che biologiche (ad esempio tossicità cronica, tossicità su più generazioni) si identificano valori sperimentali di NO(A)EL o di *Lowest Observed Adverse Effect Level* (LOAEL), che vengono poi usati come base per il calcolo dell'ADI.

In generale, nell'Unione Europea e a livello internazionale, questo approccio viene seguito per sostanze che provocano effetti tossici in organi e sistemi e/o per sostanze che causano effetti cancerogeni non legati a una primaria azione a carico del DNA, cioè per i cancerogeni non genotossici, per i quali si accetta l'esistenza di effetti legati a una soglia (cancerogeni epigenetici). Invece, per i cancerogeni genotossici il metodo di valutazione si basa oggi sul rapporto fra la dose cancerogena più bassa e l'esposizione umana, definito come Margine di Esposizione (MoE), rapporto che deve essere superiore a 10.000.

### **Evoluzione del concetto di ADI**

Il concetto di ADI ha subito alcuni perfezionamenti. Il primo è quando viene applicato al campo dei contaminanti, cioè sostanze, per definizione, non aggiunte volontariamente agli alimenti a differenza degli additivi alimentari, per cui è nato il concetto di ADI.

Infatti, il livello dei contaminanti negli alimenti (acqua compresa) è spesso difficile, se non impossibile, da controllare; può essere a volte sconosciuto e, poiché i contaminanti ovviamente non subiscono un processo pre-marketing di approvazione, i valutatori del rischio hanno a disposizione limitate informazioni scientifiche utili per una valutazione del pericolo. In questo caso, quindi, UE, USFDA e WHO impiegano la terminologia di "assunzione giornaliera tollerabile" (TDI, *tolerable daily intake*) per identificare il limite di un contaminante negli alimenti, e per distinguerlo dall'ADI. Sostanzialmente, però, la procedura per calcolare il TDI non varia significativamente da quella dell'ADI.

Il secondo cambiamento di terminologia rilevante si è avuto con l'introduzione del termine "*reference dose, RfD*", introdotto per evitare l'uso di termini pregiudiziali quali sicurezza e accettabile, e promuovere una maggiore consistenza nella valutazione dei composti non cancerogeni, e mantenere una certa separazione fra valutazione e gestione del rischio. Di nuovo, il cambiamento della terminologia non cambia la metodologia. Il NOEL (*no-observed effect level*) diventa NOAEL (*no-observed adverse effect level*), il fattore di sicurezza diventa fattore di incertezza (UF, *uncertainty factor*), l'ADI è stata rimpiazzata con la dose di riferimento (RfD).

C'è però una sottile differenza interpretativa: la definizione di ADI come dose accettabile, lasciava intendere che livelli superiori fossero inaccettabili. Questa demarcazione fra accettabile e inaccettabile è contraria alla visione della maggior parte dei tossicologi, che ritengono l'ADI una stima relativamente grossolana di un livello di esposizione cronica che ha una elevata probabilità di non causare effetti avversi/tossici nell'uomo. I valutatori del rischio ritengono l'ADI una stima "morbida" i cui margini di incertezza possono allargarsi fino ad un ordine di grandezza.

Quando è stata creata nel 1954 l'ADI dalla FDA accettabile significava accettabile; l'esposizione ad un alimento che conteneva un additivo al di sopra dell'ADI era inaccettabile secondo una definizione legale. Trent'anni dopo, l'ADI, o il suo equivalente RfD, è diventato una definizione di probabilità con un ordine di grandezza di incertezza.

### **L'approccio Benchmark Dose**

In generale, l'approccio NOAEL/LOAEL per il calcolo dell'RfD è soggetto a un certo numero di limitazioni (U.S. EPA, 1995), fra le quali:

- l'identificazione del NOAEL è spesso controversa;

- esperimenti con bassa attività biologica danno NOAELs più alti;
- la curva dose-risposta gioca un ruolo modesto nel determinare il NOAEL;
- il NOAEL è limitato alle dosi valutate.

Per superare queste limitazioni sono stati sviluppati metodi che consentono l'impiego di tutti i valori della curva dose-risposta. L'approccio *benchmark* (BM), per esempio, designa una determinata dose, che corrisponde al limite inferiore di confidenza al 95% di un certo aumento (*Benchmark Response* (BMR) generalmente 5%, o 10%) al di sopra del valore di fondo (la dose di riferimento, *benchmark dose*, BMD), sulla base del modello dose-risposta entro o vicino all'intervallo sperimentale delle dosi. È stato ipotizzato che la BMD calcolata al limite inferiore di confidenza del 95% e pari ad un aumento del 10% in più di rischio ( $BMDL_{10}$ ) è paragonabile al LOAEL, mentre quella derivata, sulla base di un rischio aumentato al 5%  $BMDL_5$ , corrisponde al NOAEL. Analisi più recenti dei dati disponibili, tuttavia, indicano che il  $BMDL_{10}$  è vicino al NOAEL. L'utilizzo di questo approccio ha diversi vantaggi: non coincide necessariamente con una delle dosi selezionate sperimentalmente (e quindi può essere utilizzato qualora non si sia riusciti a identificare un NOAEL) e può essere adattato alle dimensioni del campione e alle incertezze ad esso associate.

## Valutazione del pericolo cancerogeno

### Scelta dell'approccio

In accordo con le linee guida proposte da EPA (U.S. EPA, 1996a) per la valutazione del rischio cancerogeno, il metodo usato per caratterizzare e quantificare il rischio di cancro costituito da una sostanza chimica dipende da ciò che si sa circa il modo d'azione cancerogeno e dalla pendenza della curva dose-risposta.

Il fenomeno cancerogeno non lineare è riconosciuto avere una soglia quando è

secondario alla tossicità (cancerogeni epigenetici) che di per se stessa è un fenomeno con soglia e dipende strettamente dal modo d'azione. È, per esempio, il caso dell'effetto cancerogeno di alcuni metalli che è mediato a dosi elevate (soglia) dalla produzione di prodotti reattivi dell'ossigeno o dell'azoto (ROS/RNS).

L'assunzione presunta di linearità del meccanismo di azione dei cancerogeni "iniziato" da un effetto genotossico è accreditata da un punto di vista regolatorio dai gestori del rischio quando l'evidenza supporta che la mutazione genica sia il risultato della reattività lineare della sostanza con il DNA, o altre modalità ove non si possa escludere linearità d'azione (cioè a qualsiasi dose si ammette una attività).

Se il modo d'azione non è noto, l'uso dell'approccio lineare è una questione di metodo strategico cautelativo non basato però su evidenze scientifiche.

### Quantificazione del rischio di cancro

Le linee guida per la valutazione del rischio cancerogeno descrivono due metodi alternativi per quantificare il rischio derivante da una sostanza chimica:

**Cancerogeno epigenetico** (quando le evidenze supportano una modalità di azione non dovuta alla reattività diretta con il DNA):

HQ = dose di esposizione/RfD

HQ (*Hazard Quotient*) = un quoziente di rischio è il rapporto tra l'esposizione potenziale a una sostanza e il livello al quale non sono previsti effetti avversi. Se si calcola che il quoziente di rischio sia inferiore a 1, non sono previsti effetti avversi per la salute come risultato dell'esposizione.

RfD (*Reference Dose*) = si intende la dose (concentrazione) di sostanza tossica per la quale non sono prevedibili effetti avversi per la popolazione umana (compresi sottogruppi sensibili) esposta alla sostanza stessa durante a tutta la vita.

**Cancerogeno genotossico** (quando le evidenze supportano una modalità di azione dovuta alla reattività diretta con il DNA):

$MoE = PoD/dose$

il margine di esposizione (MoE) è basato su un modello quantitativo che impiega i dati dose-risposta quantificati come Pod o NOAEL/BMDL<sub>10</sub> associati con una stima dell'aumento del 10% nei tumori.

Il MoE è calcolato come rapporto del PoD diviso per le dosi di esposizione misurate. Il MoE può essere utilizzato per supportare una certa priorità nella gestione del rischio e, se il MoE è molto ampio, per la comunicazione di un basso livello di preoccupazione per la salute umana. A seconda dell'approccio adottato nell'individuare un PoD è possibile derivare valori molto diversi per il MoE. È quindi essenziale che la selezione dell'*endpoint* del cancro e il trattamento matematico dei dati siano chiaramente descritti e giustificati.

Il comitato scientifico di EFSA ha ritenuto che l'approccio MOE (ref) possa essere applicato alle impurezze che sono sia genotossiche che cancerogene, indipendentemente dalla loro origine. Il comitato scientifico ribadisce l'opinione espressa nel 2005 secondo cui un margine di esposizione di 10.000 o superiore, se basato sul BMDL<sub>10</sub> di uno studio sugli animali, e tenendo conto delle incertezze generali nell'interpretazione, sarebbe poco preoccupante da parte di un punto di vista della salute pubblica; l'entità di un MOE, tuttavia, indica solo un livello di preoccupazione e non quantifica il rischio (EFSA 2012).

Una altra valutazione dei cancerogeni genotossici è tramite:

CSF (*Cancer Slope Factor*): il fattore di pendenza del cancro (*Cancer Slope Factor* – CSF) viene utilizzato per stimare il rischio di cancro associato all'esposizione a cancerogeno genotossico. Il CSF definisce

quantitativamente la relazione tra dose e risposta. Poiché il rischio a bassi livelli di esposizione è difficile da misurare mediante esperimenti su animali o studi epidemiologici, lo sviluppo di un CSF comporta generalmente l'applicazione di un modello all'insieme di dati disponibili e l'utilizzo di un modello per estrapolare linearmente dalle dosi relativamente elevate somministrate negli studi su animale ai bassi livelli di esposizione previsti per l'esposizione umana.

Il CSF viene utilizzato per derivare la Dose Specifica di Rischio (*Risk Specific Dose* – RSD) espressa in mg/kg giorno per gli agenti genotossici cancerogeni. L'RSD è spesso calcolato sulla base di un rischio extra su un milione (rischio  $10^{-6}$ ), cioè la probabilità che una persona, su un milione di persone ugualmente esposte, possa contrarre il cancro se esposta continuamente (24 ore al giorno) alla concentrazione specifica per tutta la vita (70 anni). Il termine "extra" nella definizione della RSD si riferisce a un rischio derivante dall'esposizione ambientale alla sostanza chimica in esame rispetto al rischio di fondo che è sempre presente.

### ***Threshold of Toxicological Concern (TTC)*** ***o soglia di allarme tossicologico***

L'utilizzo dell'approccio pragmatico del TTC, applicabile alle sostanze chimiche senza allerta di genotossicità e non soggette per la loro approvazione ad uno specifico regolamento, è basato sul principio di stabilire una soglia di esposizione umana valida per tutte le sostanze chimiche, al di sotto della quale vi è una probabilità molto bassa del manifestarsi di un rischio apprezzabile per la salute umana. L'approccio TTC mira a selezionare e dare priorità ai composti chimici, presenti in quantità molto piccole, per i quali sono noti i dati sulla struttura chimica e sull'esposizione, ma per i quali i dati sulla tossicità sono limitati o assenti. L'approccio TTC non dovrebbe

essere utilizzato per agenti cancerogeni ad alta potenza (ossia composti aflatossina-simili, azossi- o N-nitroso, benzidine e anche idrazine), prodotti chimici inorganici, metalli e organometallici, proteine, steroidi, sostanze chimiche di cui è noto o previsto il bioaccumulo, nanomateriali, sostanze chimiche radioattive e miscele di sostanze chimiche contenenti strutture chimiche sconosciute.

Le soglie proposte per le sostanze senza allerta di genotossicità sono:

- per una sostanza chimica di classe Cramer I (bassa preoccupazione), 1800 µg/persona/giorno corrispondenti a 30 µg/kg pc/giorno;
- per i composti di Classe Cramer III (alta preoccupazione), 90 µg/persona/giorno, corrispondenti a 1,5 µg/kg pc/giorno

Le soglie proposte per le sostanze con allerta genotossica sono:

- 0,15 µg/persona/giorno, corrispondenti a 0,0025 µg/kg pc/giorno.

### Quantificazione dell'esposizione umana

La fase finale di tutto il processo è rappresentata dal confronto delle conoscenze accumulate relativamente al processo della caratterizzazione del pericolo con i dati raccolti sull'esposizione umana. È evidente che maggiore è la distanza tra il ADI/TDI/MoE e il valore di esposizione e più elevata è la probabilità che gli individui non vadano incontro a un rischio per la loro salute. Il temporaneo e/o limitato nel tempo "sforamento" dell'ADI deve essere comunque giudicato con ragionevolezza, poiché si deve costantemente tenere presente che l'ADI/TDI derivano comunque da un NOAEL, cioè "la più elevata concentrazione o quantità di una sostanza, espressa in mg/kg di peso corporeo, derivante da studi sperimentali cronici o osservazioni epidemiologiche, che non causa effetti tossici (avversi)" che, inoltre, è stata ulteriormente divisa per un fattore di almeno 100. In

altre parole, l'ADI/TDI non devono assolutamente essere considerate una soglia di tossicità, ma una soglia di sicurezza. Un discorso analogo deve essere ben chiaro nella mente del legislatore o da chi è preposto a giudicare la presenza di concentrazioni di una sostanza al di sopra dei "limiti di legge" (MRL); infatti superare i limiti imposti dalla legge, di solito estremamente cautelativi da un punto di vista sanitario, non è da correlare immediatamente ad un aumentato rischio tossicologico per le ragioni sopra esposte.

### Lettere consigliate

Barnes, D.G., Dourson, M.L., 1988. *Reference Dose (RfD): description and use in health risk assessments*. Regul. Pharmacol. Toxicol. 8, 471-486 Also at <http://www.epa.gov/IRIS/rfd.htm>.

Carrington CD, Bolger PM. *The limits of regulatory toxicology*. Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Mar 1;243(2):191-7.

Carrington, P.D., 2008. *Freedom to err: the idea of natural selection in politics, schools, and courts*. William Mary Bill Rights J. 17, 1-42.

Crump, K., 1984. *A new method for determining allowable daily intakes*. Fundam. Appl. Tox. 4, 854-871.

Dourson, M.L., Stara, J.F., 1983. *Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factors*. Regul. Pharmacol. Toxicol. 3, 224-238.

<https://echa.europa.eu/it/>

EFSA 2009 *Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA on the use of the benchmark dose approach in risk assessment*. The EFSA Journal (2009) 1150, 1-72.

EFSA Scientific Committee, Hardy A, Benford D, Hall-dorsson T, Jeger MJ, Knutsen KH, More S, Mortensen A, Naegeli H, Noteborn H, Ockleford C, Ricci A, Rychen G, Silano V, Solecki R, Turck D, Aerts M, Bodin L, Davis A, Edler L, Gundert-Remy U, Sand S, Slob W, Bottex B, Abrahantes JC, Marques DC, Kass G and Schlatter JR, 2017. *Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment*. EFSA Journal 2017;15(1):4658, 41 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4658.

EFSA 2012 *Scientific Committee; Scientific Opinion on the applicability of the Margin of Exposure approach for the safety assessment of impurities which are both genotoxic and carcinogenic in substances added to food/feed*. EFSA Journal 2012;10(3):2578. [5 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2578. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/journal/18314732>

<https://www.epa.gov/>

FAO/WHO (1958). *Procedures for the testing of intentional food additives to establish their safety for use. Second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 144*, Geneva.

<https://www.fda.gov/>

<https://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>

Galli C.L., Marinovich M., Lotti M. *Is the acceptable daily intake as presently used an axiom or a dogma? Toxicol Lett.* 2008 Aug 15;180(2):93-9.

International Programme on Chemical Safety (2000). *Lead. WHO Food Additive Series 44. World Health Organization*, Geneva.

International Programme on Chemical Safety, 1987. *Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. Environmental Health Criteria 70. World Health Organization*, Geneva.

Lehman, A.J., Fitzhugh, O.G., 1954. *100-Fold margin of safety. Q. Bull. Assoc. Food Drug Officials* 18, 33-35.

Mantel, N., Bryan, W.R., 1971. "Safety" testing of carcinogenic agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 27, 455-470.

U.S. Environmental Protection Agency, 1996. *Proposed guidelines for carcinogen risk assessment. Federal Register* 61(79), 17960-18010.

U.S. EPA. (1996a) *Proposed guidelines for carcinogen risk assessment. Federal Register* 61(79):17960-18011.

USEPA. (1999) *Guidelines for Carcinogenic Risk Assessment. Review Draft. July 1999. US Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum.*

World Health Organization (WHO). (1998) *Guidelines for drinking-water quality. Second edition. Addendum to volume 2. Health criteria and other supporting information. Chloroform. Geneva: World Health Organization*, pp. 255-275.