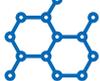


GIORNALE ITALIANO DI   
TOSSICOLOGIA

Organo ufficiale della Società Italiana di Tossicologia - SITOX



Anno III n. 2 - Novembre 2024



SOCIETÀ ITALIANA DI TOSSICOLOGIA

Riconosciuta con DPR 16/05/1972, n. 376
Iscritta nel Registro delle Persone
Giuridiche della Prefettura di Milano n. 351
pag. 606 vol. II

SEDE LEGALE E OPERATIVA
Via Giovanni Pascoli, 3 - 20129 Milano
02.29520311

segreteria@sitox.org
www.sitox.org

CONSIGLIO DIRETTIVO

PRESIDENTE
Orazio Cantoni

PRESIDENTE ELETTO
Guido Mannaioni

PAST PRESIDENT
Corrado L. Galli

SEGRETARIO
Roberto Russo

CONSIGLIERI
Santa Cirmi
Fabiana Morroni
Valeria M. Petrolini
Emanuela Testai
Luca Tosti
Barbara Viviani

GIORNALE ITALIANO DI TOSSICOLOGIA

DIRETTORE RESPONSABILE
Sarah Vecchio

COMITATO DI REDAZIONE
Salvatore Bianco *Dispositivi Medici*
Luisa Borgia *Bioetica*
Frida Bushati *Comunicazione*
Orazio Cantoni *Tossicologia Cellulare,
Tossicologia Sperimentale*
Claudio Colosio *Tossicologia Occupazionale*
Emanuela Corsini *Interferenti Endocrini,
Tossicologia Cellulare*
Ivano Eberini *New Approach Methodology*
Corrado L. Galli *Tossicologia Sperimentale,
Emergenze Tossicologiche*
Costanza Rovida *Tossicologia Regolatoria*
Marinella Trovato *Sicurezza alimentare*
Sarah Vecchio *Farmaco-Tossicologia Clinica,
Medicina delle Dipendenze,
Tossicologia di Genere*

SEGRETERIA DI REDAZIONE
M. Elena Scamoni

Pubblicazione iscritta nel
Registro della Stampa,
Tribunale di Milano, N. 332 del 31.05.97

REALIZZAZIONE GRAFICO EDITORIALE
PUBLIEDIT Edizioni e Pubblicazioni s.a.s -
Cuneo/Roma.

Sommario

- _____ p. 1 **Vecchie e nuove sfide nella valutazione del rischio tossicologico**
Corrado L. Galli
- _____ p. 8 **Considerazioni sulla rilevanza per l'uomo degli studi sperimentali**
Angelo Moretto
- _____ p. 13 **Tossicologia di genere**
Patrizia Hrelia
- _____ p. 18 **Modelli QSAR e Approcci Read-Across: Strumenti Fondamentali per la Valutazione del Rischio**
Omar Ben Mariem, Luca Palazzolo, Ivano Eberini
- _____ p. 20 **Il ruolo degli Adverse Outcome Pathways (AOPs) nella Tossicologia Moderna**
Miriam Midali, Melania Serafini, Barbara Viviani
- _____ p. 23 **Tutti i modelli sono sbagliati, ma alcuni sono utili**
Luca Palazzolo, Ivano Eberini

È possibile inviare contributi per la pubblicazione sul Giornale Italiano di Tossicologia. I contributi potranno essere inviati direttamente alla Segreteria di Redazione del giornale (SITOX, segreteria@sitox.org) o ai referenti delle aree tematiche.

Il Comitato Editoriale si riserva di valutare tempi e modi per la pubblicazione dei contributi.

Vecchie e nuove sfide nella valutazione del rischio tossicologico

Corrado L. Galli

Università degli Studi di Milano, Past President SITOX

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 espone 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

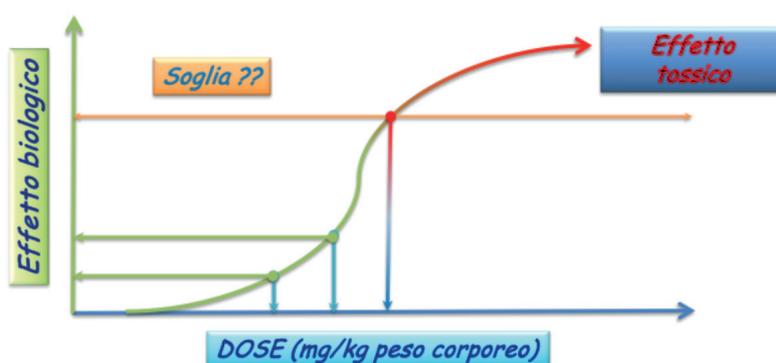
alla determinazione di una curva esposizione (dose)/ effetto (risposta biologica) (Qual è il livello di esposizione a cui si possono definire le soglie di non effetto, NOAE e BMD, oppure gli effetti avversi/tossici e, conseguentemente, calcolo delle dosi ritenute sicure per la popolazione, DGA o ADI,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

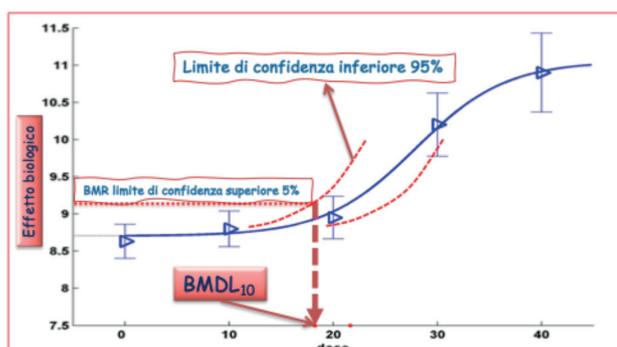
Tradizionalmente, quando i dati sperimentali sugli animali vengono utilizzati per la valutazione del rischio di sostanze negli alimenti che non sono genotossiche e cancerogene, il livello senza effetti avversi osservati (NOAEL) e/o il livello più basso di effetti avversi osservati (LOAEL) per l'effetto 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.

Considerazioni sulla rilevanza per l'uomo degli studi sperimentali

Angelo Moretto

Università degli Studi di Padova

Introduzione

La maggior parte delle informazioni tossicologiche sui composti chimici con i quali l'uomo entra in contatto derivano da studi su animali. Pertanto, un problema fondamentale è quello della estrapolazione di questi dati, non solo quantitativa ma anche qualitativa; ovvero, diventa essenziale definire la rilevanza per l'uomo di quanto descritto nell'animale da esperimento. Nel contesto della discussione che segue si intende per rilevanza per l'uomo l'effettiva correttezza di applicare all'uomo gli effetti tossicologici (rilevanza qualitativa) e le relative relazioni dose-risposta (rilevanza quantitativa) riscontrate nell'animale da esperimento.

Il problema della rilevanza per l'uomo è stato inizialmente affrontato per gli effetti cancerogeni, in seguito anche per gli altri effetti tossici. Il problema si è posto in seguito all'evoluzione della comprensione della biologia del cancro e l'identificazio-

ne degli eventi chiave nel processo di cancerogenesi. Storicamente, le valutazioni si basano sugli studi sui roditori e, per i composti in uso da molto tempo e con, talora, elevate esposizioni soprattutto professionali, anche sugli studi epidemiologici. Intrinseco nelle valutazioni basate sugli studi sui roditori era l'assunto che dall'osservazione dei tumori in animali da laboratorio si potessero identificare sostanze potenzialmente cancerogene per l'uomo per le quali, mediante l'uso di modelli matematici, fornire stime del rischio.

La rilevanza dei risultati degli studi di cancerogenesi sperimentale

Con l'aumentare delle conoscenze, risulta sempre più evidente che un numero apprezzabile di sostanze chimiche causano un'aumentata incidenza di cancro negli animali da laboratorio attraverso processi che non comportano un'interazione diretta con il DNA. Si è ora in una situazione in cui si conoscono molti dei processi biologici

coinvolti nella cancerogenesi e la sequenza di questi processi può essere descritta e riassunta nel concetto di modo d'azione (MOA). Un MOA postulato per la cancerogenesi è una sequenza plausibile di eventi chiave che portano a un effetto osservato. Questa sequenza, che deve avere il sostegno di osservazioni sperimentali e dati, descrive i principali eventi citologici e biochimici misurabili che sono necessari per causare l'osservato effetto cancerogeno.

Il modo d'azione e la rilevanza per l'uomo

Fondamentale nello sviluppo di questo concetto è una pubblicazione prodotta sotto gli auspici dell'International Programme of Chemical Safety coordinato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità inizialmente riportata in Sonich-Mullin et al. (2001). Questa pubblicazione descrive un "framework" che fornisce un approccio strutturato alla valutazione del peso complessivo degli elementi di prova per postulare un MOA.

L'approccio si basa su tre domande fondamentali:

1. Se la forza probante degli elementi di prova sia sufficiente per stabilire un MOA negli animali?
2. Gli eventi chiave del MOA animale sono plausibili nell'uomo?
3. Considerando i fattori tossicocinetici e tossicodinamici, gli eventi fondamentali del MOA animale sono plausibili nell'uomo?

Le domande 2 e 3 implicano considerazioni, rispettivamente, qualitative e quantitative, nell'analisi di concordanza delle informazioni relative al MOA animale e ai suoi eventi chiave.

Per rispondere alla prima domanda è necessario applicare alcuni criteri di causalità in logica successione e mutuati dalle considerazioni di Bradford-Hill utilizzati in epi-

demiologia:

1. MOA postulato.
2. Eventi chiave; parametri critici associati.
3. Relazioni dose-risposta.
4. Associazione temporale.
5. Forza, coerenza e specificità dell'associazione della chiave con la risposta tumorale.
6. Plausibilità e coerenza biologica.
7. Possibili MOA alternativi.
8. Incertezze, incongruenze e lacune nei dati.
9. Conclusione sul MOA.

La risposta alla seconda domanda richiede la valutazione qualitativa della pertinenza del MOA all'eventuale sviluppo del cancro nell'uomo. Per questo è necessario valutare se gli eventi chiave specifici che si verificano nel MOA animale possano verificarsi nell'uomo.

In generale, i dettagli degli eventi chiave iniziali sono probabilmente più specifici per le sostanze chimiche, ad esempio l'enzima risposta di induzione da parte del fenobarbital nel fegato di roditore, o la formazione di un metabolita citotossico dal cloroformio mediante enzima/i citocromo P-450. Gli eventi successivi, invece, sono più generici al MOA, quali, ad esempio, la stimolazione pleiotropica della proliferazione o l'iperplasia rigenerativa. Pertanto, la valutazione della concordanza nell'uomo degli eventi chiave per il MOA per una data sostanza chimica non è specifica per quella sostanza, ma è generalizzabile al MOA nell'uomo.

Le informazioni che possono essere utilizzate per valutare gli eventi chiave negli esseri umani possono provenire da studi

in vitro e *in vivo* sulla sostanza stessa, ma anche da informazioni di base riguardanti l'anatomia, la fisiologia, l'endocrinologia, le malattie genetiche, l'epidemiologia e qualsiasi altro tipo di informazioni riguardo agli eventi chiave nell'uomo.

Nella valutazione della concordanza delle informazioni nell'uomo a quello negli animali, è necessario tenere in considerazione e descrivere alcuni punti fondamentali quali:

- Incidenza del cancro nel sito anatomico e tipo cellulare di interesse,
- Conoscenza della natura e della funzione del sito bersaglio, compresi lo sviluppo, la struttura (macro e microscopica), meccanismi di controllo a livello fisiologico, cellulare e livelli biochimici,
- Condizioni patologiche umane e animali che forniscono informazioni per quanto riguarda la regolazione e la reattività degli organi bersaglio,
- Risposte umane e animali alla sostanza chimica, o analoghi, a esposizioni a breve, medio o lungo termine, compresi gli organi bersaglio e gli effetti.

Alla conclusione del processo sarà possibile concludere se il MOA osservato nell'animale è o meno presente anche nell'uomo e, quindi, se i dati sull'animale sono o meno applicabili all'uomo. Qualora i dati non fossero conclusivi è evidente che, a scopo precauzionale, si dovranno ritenere pertinenti per l'uomo.

Per quanto riguarda la rilevanza quantitativa è necessario tener conto di tutte le informazioni tossicocinetiche e tossicodinamiche disponibili sia sugli animali da esperimento che sugli esseri umani. Tali dati dovranno comprendere informazioni sulle dosi biologicamente efficaci necessarie per produrre le risposte dinamiche da cui può derivare lo sviluppo della neoplasia.

Se un evento chiave di un MOA di un determinato composto richiede una dose sperimentale elevata, allora la rilevanza per il rischio per l'uomo diventa una questione di esposizione. Questo è particolarmente vero quando l'uomo dimostri una sensibilità inferiore a quella dell'animale e che l'innescò dell'effetto richieda dosi così elevate da non essere plausibili nel caso di esposizioni reali dell'uomo. Pertanto, in questo caso, la valutazione dell'esposizione dell'uomo è fondamentale per una corretta valutazione del potenziale, e quindi del rischio, di causare cancro nell'uomo. Di conseguenza, anche la comprensione e conoscenza della relazione dose-risposta è fondamentale al fine di derivare modelli di estrapolazione che siano coerenti con la nostra comprensione della biologia.

In alcune occasioni vi possono non essere informazioni sufficienti sugli eventi chiave nell'uomo. In questo caso, potrebbero essere utilizzati dati epidemiologici. Ad esempio, il database biochimico e citologico sugli eventi chiave nell'uomo per composti che agiscono come il fenobarbital tramite l'attivazione del recettore CAR per indurre tumori epatici è incompleto. Tuttavia, esistono dati epidemiologici solidi che dimostrano che l'esposizione al fenobarbital per periodi prolungati a dosi relativamente elevate non provoca il cancro nell'uomo. Una possibilità, quindi, è quella di "leggere" da questi risultati con fenobarbital e applicarli a qualsiasi altro composto che ne condivida il MOA negli animali nell'indurre tumori epatici nei roditori e concludere che tumori causati da un tale composto non sono quantitativamente rilevanti per la valutazione del rischio del composto nell'uomo.

Conclusione sugli effetti cancerogeni

In conclusione, le nostre conoscenze attuali sulla biologia del cancro ci permettono di valutare la rilevanza per l'uomo dei dati sperimentali ottenuti sull'animale. In alcuni casi, gli effetti sull'animale posso-

no essere considerati del tutto irrilevanti per l'uomo per la presenza di un peculiare MOA. In altri casi, considerazioni quantitative possono indicare che l'effetto sull'uomo, benchè plausibile dal punto di vista tossicologico, non è mai atteso per questioni di dose; ovvero che la dose richiesta per ottenere l'effetto nell'uomo è talmente elevata che non potrà essere raggiunta in condizioni reali. Queste considerazioni si applicano alla valutazione del rischio, per cui, ad esempio, la derivazione dei limiti di esposizione può seguire procedure adeguate alle conclusioni sul MOA. Con maggiore difficoltà queste possono essere applicate alla classificazione delle sostanze e all'uso che si fa talora della classificazione. Infatti, è possibile che in alcuni casi sulla base di considerazioni sul MOA una sostanza sia classificata in modo dubitativo ("probabilmente cancerogena"). Però, per alcune categorie di sostanze la gestione del rischio è fatta sulla base della classificazione (ovvero dell'identificazione del pericolo che è qualitativa) e non della valutazione del rischio (che è quantitativa). In questo modo si possono introdurre limiti o restrizioni eccessivi, non giustificati dalle conoscenze tossicologiche e biologiche. Questo risulta in uno spreco di risorse sia per gli studi fatti e non utilizzati per le decisioni, sia per l'imposizione di inutili limiti e restrizioni economicamente onerosi.

Gli effetti non cancerogeni

Per quanto riguarda gli effetti non cancerogeni si possono fare delle considerazioni aggiuntive. Infatti, la conoscenza degli eventi chiave di un effetto tossicologico possono permettere l'applicazione di fattori di incertezza diversi dai valori predefiniti. Infatti, in genere, nella derivazione dei limiti di esposizione per l'uomo sulla base dei dati animali si applicano i cosiddetti fattori di incertezza (o sicurezza) per tener conto delle possibili differenze di specie fra l'animale e l'uomo (fattore 10, interspecie)

e differenze di sensibilità all'interno della specie umana (fattore 10, intraspecie), Questo fattore 10x10 (100) è applicato alla dose senza effetto nell'animale da esperimento (NOAEL, no observable adverse effect level). In presenza di informazioni comparative sulla relazione dose-risposta o su altri parametri fisiologici o tossicologici, si possono calcolare e applicare fattori specifici (CSAF, chemical specific assessment factor), in cui uno o più dei valori predefiniti per le differenze di specie o interindividuali nella tossicocinetica o nella tossicodinamica vengono sostituite da un valore basato su informazioni specifiche per la sostanza chimica. Tali informazioni possono portare a un aumento o, più spesso, a una diminuzione valore rispetto al normale default di 100. Da qui si possono derivare limiti di esposizione meno stringenti, senza aumentare il rischio per la popolazione esposta, ma con possibile beneficio economico.

L'analisi del MOA può contribuire, inoltre, all'individuazione di eventuali sottopopolazioni (ad esempio, quelle con predisposizione genetica) che possono essere a maggior rischio, anche solo in alcune specifiche fasi della vita.

Conclusioni

Concludendo, i progressi fatti dalla biologia e dalla tossicologia permettono in molti casi di comprendere la rilevanza per l'uomo delle osservazioni fatte nell'animale da esperimento. Da questo deriva una migliore valutazione del rischio, con significative ricadute per la sicurezza delle popolazioni esposte e con possibili risparmi sulle risorse da investire per la sicurezza.

Bibliografia

1. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W. *IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. Crit Rev Toxicol. 2006 Nov-Dec;36(10):781-92. doi: 10.1080/10408440600977677. PMID: 17118728*

2. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco VL, Doe JE, Fenner-Crisp PA, Moretto A, Pastoor TP, Schoeny RS, Seed JG, Wolf DC. Classification schemes for carcinogenicity based on hazard-identification have become outmoded and serve neither science nor society. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016 Dec;82:158-166. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.10.014. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27780763.
3. Boobis AR, Doe JE, Heinrich-Hirsch B, Meek ME, Munn S, Ruchirawat M, Schlatter J, Seed J, Vickers C. IPCS framework for analyzing the relevance of a noncancer mode of action for humans. *Crit Rev Toxicol.* 2008;38(2):87-96. doi: 10.1080/10408440701749421. PMID: 18259981.
4. Doe JE, Boobis AR, Cohen SM, Dellarco VL, Fenner-Crisp PA, Moretto A, Pastoor TP, Schoeny RS, Seed JG, Wolf DC. The codification of hazard and its impact on the hazard versus risk controversy. *Arch Toxicol.* 2021 Nov;95(11):3611-3621. doi: 10.1007/s00204-021-03145-6. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34559250; PMCID: PMC8492552.
5. Fukunaga S, Ogata K, Eguchi A, Matsunaga K, Sakurai K, Abe J, Cohen SM, Asano H. Evaluation of the mode of action and human relevance of liver tumors in male mice treated with epyrifenacil. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2022 Dec;136:105268. doi: 10.1016/j.yrtph.2022.105268. Epub 2022 Oct 6. PMID: 36210011.
6. Meek ME, Boobis A, Cote I, Dellarco V, Fotakis G, Munn S, Seed J, Vickers C. New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *J Appl Toxicol.* 2014 Jan;34(1):1-18. doi: 10.1002/jat.2949. Epub 2013 Oct 25. PMID: 24166207; PMCID: PMC6701984.
7. Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M; International Programme on Chemical Safety. IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2001 Oct;34(2):146-52. doi: 10.1006/rtph.2001.1493. PMID: 11603957.

Tossicologia di genere

Patrizia Hrelia

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Il concetto di “sesso” e “genere” riveste oggi un’importanza cruciale nel campo della ricerca scientifica, della medicina e delle scienze sociali. È essenziale chiarire la distinzione tra i due termini: il sesso si riferisce alle caratteristiche biologiche e fisiologiche che distinguono maschi e femmine, come la genetica, gli organi riproduttivi e i livelli ormonali. Il genere, invece, è una costruzione sociale e culturale che riguarda i ruoli, i comportamenti e le identità attribuite a uomini e donne, basata su fattori psicosociali e non strettamente biologici (Arnegard et al., 2020; Reale et al., 2023). Le differenze tra sesso biologico e identità di genere sono fondamentali per comprendere come queste influenzino la salute, il comportamento e le esperienze di vita delle persone. Esistono anche identità di genere che non corrispondono al binario maschio-femmina, come le persone non binarie o gender-fluid, che arricchiscono ulteriormente il dibattito sulla complessità dell’identità umana (Circincione e Wang, 2021).

Nell’ambito della medicina di genere, la tossicologia di genere è una disciplina emergente che esplora come le differenze biologiche e fisiologiche, sociali e legate allo stile di vita tra uomini e donne influenzino la risposta a tossine, farmaci e altre sostanze chimiche, cercando di comprendere come queste contribuiscano alla suscettibilità agli effetti tossici e ai rischi per la salute. Storicamente, la ricerca tossicologica ha trascurato queste differenze, concentrandosi principalmente su soggetti di sesso maschile, ma studi recenti hanno dimostrato che le differenze di sesso/genere nella risposta ai farmaci e agli agenti tossici possono essere significative. La crescente consapevolezza dell’importanza delle differenze di genere ha portato a una rivalutazione delle pratiche di ricerca e delle strategie di prevenzione e trattamento (Gochfeld, 2017).

La rilevanza della tossicologia di genere

L’importanza e l’attualità di questo tema risiedono nel fatto che considerare solo il

nesso biologico può portare a studi incompleti e terapie non efficaci per una parte significativa della popolazione. È quindi sempre più evidente la necessità di includere entrambi gli aspetti nelle analisi scientifiche, nella pianificazione delle cure e nei percorsi di prevenzione. Includere la dimensione del genere nella ricerca e nella pratica clinica rappresenta un passo verso una società più equa e inclusiva, che valorizza la diversità delle esperienze umane.

La tossicologia di genere si basa sul concetto che le differenze tra uomini e donne non si limitano agli organi riproduttivi, ma coinvolgono una vasta gamma di processi biologici e fisiologici. Queste differenze influenzano la farmacocinetica (come uno xenobiotico viene assorbito, distribuito, metabolizzato ed eliminato dal corpo) e la farmacodinamica (come uno xenobiotico esercita il suo effetto). Ad esempio, le differenze nella composizione corporea, come la percentuale di massa grassa, e nella funzione renale possono influire sulla distribuzione e sull'eliminazione delle sostanze chimiche.

Le donne hanno generalmente una percentuale di massa grassa più alta rispetto agli uomini e una massa muscolare inferiore. Questo può influire sulla distribuzione di farmaci liposolubili, che tendono a concentrarsi nei tessuti adiposi e quindi rimanere nel corpo per periodi più lunghi. Inoltre, le donne hanno spesso una funzione renale diversa rispetto agli uomini, il che può influenzare la clearance dei farmaci. Questi fattori possono portare a differenze significative nella risposta ai farmaci e a xenobiotici tra i sessi, con potenziali implicazioni per la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti e dell'esposizione (Allegra et al., 2023; Hrelia, 2013; 2023).

Influenza degli ormoni sessuali

Gli ormoni sessuali, come gli estrogeni, il progesterone e il testosterone, giocano un

ruolo cruciale nella modulazione della risposta del corpo alle sostanze chimiche. Gli estrogeni, ad esempio, possono influenzare l'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci, come quelli del citocromo P450. Questo gruppo di enzimi è responsabile della metabolizzazione di numerosi farmaci e sostanze tossiche, e le variazioni nella loro attività possono portare a differenze significative nella farmacocinetica tra uomini e donne (Zucker e Prendergast, 2020).

Ad esempio, il metabolismo è dimorfico, con enzimi di fase 1 (come i citocromi P450) e fase 2 (come le UDP-glucuronil-transferasi) che mostrano attività diversa tra i sessi. Ad esempio, l'isoforma CYP3A4 metabolizza il 50-60% dei farmaci e ha una clearance maggiore nelle donne, influenzata anche dal peso corporeo. La CYP2D6, più attiva negli uomini, comporta una clearance maggiore di alcuni farmaci, risultando in livelli ematici più alti nelle donne, specialmente in chi usa contraccettivi orali.

Durante il ciclo mestruale, i livelli di estrogeni e progesterone fluttuano, influenzando la risposta del corpo agli xenobiotici. Ad esempio, è stato dimostrato che le donne possono avere una maggiore sensibilità agli effetti collaterali dei farmaci in determinate fasi del ciclo mestruale. Inoltre, durante la gravidanza, i livelli di questi ormoni aumentano drasticamente, portando a modifiche significative nel metabolismo dei farmaci. Questo può rendere necessario un aggiustamento della dose per garantire l'efficacia del trattamento e minimizzare i rischi per il prodotto del concepimento.

Differenze di genere nella risposta ai farmaci

Le differenze di genere nella risposta ai farmaci sono ben documentate in diversi ambiti terapeutici (Lee et al., 2023). Ad esempio, nelle malattie cardiovascolari, le donne possono rispondere in modo diverso rispetto agli uomini ai farmaci utilizzati

per trattare l'ipertensione e altre condizioni cardiache. Le donne tendono ad avere una pressione arteriosa più bassa rispetto agli uomini e possono essere più sensibili agli effetti diuretici e ipotensivi di alcuni farmaci. Queste differenze richiedono una personalizzazione delle dosi per evitare effetti avversi e migliorare l'efficacia del trattamento.

Anche nella terapia del dolore si osservano differenze di genere. Gli studi hanno dimostrato che le donne possono rispondere in modo più sensibile agli analgesici oppioidi rispetto agli uomini, ma possono anche essere più suscettibili agli effetti collaterali, come nausea e vertigini. Queste differenze possono essere attribuite a variazioni nel metabolismo dei farmaci e nella sensibilità dei recettori del dolore. La comprensione di queste differenze è fondamentale per garantire un trattamento adeguato e sicuro per entrambi i sessi.

Esposizione ambientale e rischi di genere

La tossicologia di genere non si limita allo studio delle reazioni avverse associate all'uso dei farmaci, ma si estende anche ai rischi ambientali. Donne e uomini possono essere esposti a diversi tipi di sostanze chimiche nel loro ambiente quotidiano, e queste esposizioni possono avere conseguenze differenti. Le donne, ad esempio, possono essere esposte a rischi specifici legati all'ambiente domestico o professionale. Prodotti chimici presenti in cosmetici, prodotti per la pulizia e altri articoli di uso quotidiano possono avere effetti diversi su uomini e donne, in parte a causa delle differenze nella frequenza e nelle modalità di esposizione.

Questi prodotti contengono spesso sostanze chimiche che possono interferire con il sistema neuroendocrino, aumentando il rischio di malattie legate agli ormoni, come il cancro al seno (Peng et al., 2023).

Gli uomini, d'altra parte, possono essere più esposti a sostanze chimiche tossiche attra-

verso l'ambiente lavorativo. Ad esempio, l'esposizione a solventi industriali, pesticidi e altri agenti chimici è spesso più elevata tra gli uomini, sovra rappresentati anche in settori come l'edilizia e l'agricoltura. Tuttavia, anche in questi casi, le differenze di genere possono influenzare la suscettibilità agli effetti tossici di queste sostanze (Schlünssen e Jones, 2023).

Si evidenzia quindi la necessità di sviluppare strategie di prevenzione e regolamentazione che tengano conto delle differenze di genere, per proteggere in modo più efficace la salute di tutta la popolazione (Bolte et al., 2021). Ad esempio, la valutazione del rischio chimico dovrebbe includere dati specifici per genere, così da garantire che le normative siano adeguate per entrambi i sessi.

Il ruolo della ricerca e della regolamentazione

Negli ultimi decenni, c'è stata una crescente consapevolezza dell'importanza di considerare le differenze di sesso/genere nella ricerca tossicologica. Tuttavia, permangono ancora molte sfide. Gli studi preclinici, condotti su animali da laboratorio, spesso utilizzano solo animali maschi per evitare le variazioni ormonali che potrebbero complicare l'interpretazione dei dati. Questo approccio, sebbene pratico, porta a una visione incompleta degli effetti tossici delle sostanze, che potrebbe non riflettere accuratamente la realtà per il sesso femminile (Duffy et al., 2021; Garcia-Sifuentes e Maney, 2021).

Allo stesso modo, anche gli studi clinici sull'uomo hanno storicamente escluso o sottorappresentato le donne, specialmente quelle in età fertile, a causa dei timori legati ai potenziali effetti in questo nucleo di vulnerabilità. Questo ha portato a una mancanza di dati specifici per genere su molti farmaci e sostanze chimiche. Le normative attuali con enti come la FDA (Food and

Drug Administration) richiedono ora l'inclusione di dati di genere negli studi clinici.

Nel 2016, il National Institutes of Health (NIH) ha stabilito che il sesso debba essere incluso come variabile biologica negli studi scientifici (NIH, 2015).

La decisione ha avuto un impatto positivo e ha portato a numerosi successi nel campo della ricerca (Arnegard et al., 2020).

Tuttavia, è fondamentale continuare a promuovere un'analisi approfondita delle differenze di suscettibilità a sostanze chimiche e delle evidenze cliniche attraverso variabili intersezionali, come il sesso, la razza e il genere, per garantire misure protettive adeguate per tutti. In particolare, settori come la tossicologia dovrebbero essere incoraggiati a valutare queste variabili in modo rigoroso, poiché le differenze nei rischi di esposizione ambientale possono essere influenzate da molteplici fattori biologici e sociali.

La necessità di una nuova impostazione nella ricerca tossicologica, in quella clinica e nello sviluppo di farmaci è quindi evidente, richiedendo l'inclusione delle differenze di genere, anche per migliorare la precisione e l'efficacia delle cure (Rodriguez et al., 2015). Questo approccio dovrebbe considerare non solo il sesso biologico, ma anche parametri come età, etnia, livello culturale e condizioni sociali ed economiche. Una specifica attenzione dovrebbe essere posta alle necessità sanitarie specifiche delle persone transessuali e intersessuali, poiché le loro esperienze di esposizione a sostanze chimiche e di vulnerabilità biologica possono essere diverse rispetto a quelle della popolazione cisgender. Questo approccio inclusivo mira a ridurre le disparità nell'approccio alla cura e a garantire che tutti i gruppi siano rappresentati e protetti in modo equo nelle politiche di salute pubblica.

Verso una tossicologia di precisione

Le interazioni uomo-ambiente vanno oltre la genetica, poiché questioni complesse e intersezionali come razza, stato socio-economico e genere influenzano l'esposizione delle persone ai rischi ambientali, la risposta a tali esposizioni e l'assistenza sanitaria ricevuta. Per il futuro, è necessario affrontare le complessità che derivano dalle interazioni tra l'ambiente sociale e fisico, oltre alla genetica e agli ormoni, e integrare queste considerazioni nella progettazione degli studi scientifici. Questo approccio più inclusivo e completo permette di ottenere una comprensione più approfondita delle vulnerabilità umane legate all'esposizione ambientale, garantendo migliori misure di protezione per tutti.

Un analogo approccio nell'ambito clinico potrebbe migliorare significativamente la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti farmacologici, riducendo gli effetti collaterali e migliorando gli esiti clinici (Moyer et al., 2029). Inoltre, potrebbe portare a una migliore comprensione dei rischi tossicologici e a strategie di prevenzione più efficaci, adattate alle esigenze specifiche di uomini e donne (Mauvais-Jarvis et al., 2020).

La ricerca futura dovrebbe concentrarsi sull'identificazione dei meccanismi alla base delle differenze di genere nella tossicologia, esplorando come le variabili genetiche, epigenetiche e ambientali interagiscano per influenzare la risposta del corpo alle sostanze chimiche. Questo richiede un approccio interdisciplinare, che integri conoscenze provenienti dalla tossicologia, dalla biologia molecolare, dalla farmacologia e dalla medicina di genere.

È inoltre importante considerare anche le implicazioni etiche legate alle differenze di genere nella tossicologia e nella medicina (Borgia, 2023). La mancata considerazione delle differenze di genere nei trial clinici e negli studi tossicologici non solo limita

la nostra comprensione scientifica, ma può anche portare a disuguaglianze nell'accesso a cure sicure ed efficaci.

Conclusioni

La tossicologia di genere rappresenta una frontiera importante per la salute pubblica e la medicina. Le differenze tra uomini e donne nella risposta alle sostanze chimiche, sia naturali che sintetiche, sono profonde e complesse, influenzate da una vasta gamma di fattori biologici, ambientali e sociali. Ignorare queste differenze può portare a trattamenti inadeguati e a rischi non necessari, mentre riconoscerle e integrarle nella pratica clinica e nella regolamentazione può migliorare significativamente la sicurezza e l'efficacia delle cure.

Promuovere una maggiore attenzione alla tossicologia di genere nella ricerca, nella regolamentazione e nella pratica clinica è essenziale per garantire che uomini e donne ricevano trattamenti sicuri, efficaci e personalizzati. Solo attraverso un approccio consapevole e inclusivo potremo migliorare la nostra comprensione degli effetti tossici legati all'esposizione e, di conseguenza, proteggere meglio la salute di tutti.

Bibliografia

1. Allegra S., Cocetta V., De Francia S., Hrelia P., Montopoli M. (2023) Differenze biologiche e di genere in tossicologia: quali possibili applicazioni? *G.I. Tossicol.* 1, 22-24.
2. Borgia L. (2023) Esclusione del sesso femminile dagli studi preclinici e clinici: quando la neutralità diventa bias. *Una riflessione bioetica. G.I.Tossicol.* 2, 10-18.
3. Arnegard M. E., Whitten L. A., Hunter C., Clayton J. A. (2020). Sex as a biological variable: a 5-year progress report and call to action. *J. Womens Health* 29 (6), 858-864.
4. Bolte G., Jacke K., Groth K., Kraus U., Dandolo L., Fiedel L., et al. (2021). Integrating sex/gender into environmental health research: development of a conceptual framework. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (22), 12118.
5. Cirrincione LR, Huang KJ. (2021). Sex and Gender Differences in Clinical Pharmacology: Implications for Transgender Medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2021, 110(4):897-908.
6. Duffy K. A., Ziolek T. A., Epperson C. N. (2020). Filling the regulatory gap: potential role of institutional review boards in promoting consideration of sex as a biological variable. *J. Womens Health* 29 (6), 868-875.
7. Garcia-Sifuentes Y., Maney D. L. (2021). Reporting and misreporting of sex differences in the biological sciences. *eLife* 10, e70817.
8. Gochfeld M. (2017). Sex differences in human and animal toxicology. *Toxicol. Pathol.* 45 (1), 172-189.
9. Lee KMN, Rushovich T, Gompers A, Boulicault M, Worthington S, Lockhart JW, Richardson SS. (2023) A Gender Hypothesis of sex disparities in adverse drug events. *Soc Sci Med* ;339:116385.
10. Hrelia P. *Questioni di sesso-genere in tossicologia. In: Manuale di medicina di sesso-genere (Franconi F e Cantelli Forti G. Eds, Bononia University Press, 2013, 237-250.*
11. Hrelia P. (2023) .Tossicologia e medicina di genere. *G.I. Tossicol*, 2, 4-9.
12. Mauvais-Jarvis F., Bairey Merz N., Barnes P. J., Brinton R. D., Carrero J.-J., DeMeo D. L., et al. (2020). Sex and gender: modifiers of health, disease, and medicine. *Lancet* 396 (10250), 565-582.
13. Moyer AM, Matey ET, Miller VM. (2019) Individualized medicine: Sex, hormones, genetics, and adverse drug reactions. *Pharmacol Res Perspect.* 7(6), e00541.
14. National Institutes of Health (NIH) (2015). NOT-OD-15-102: Consideration of sex as a biological variable in NIH-funded research. Bethesda, MD: National Institutes of Health.
15. Peng FJ, Palazzi P, Mezzache S, Adelin E, Bourakba N, Bastien P, Appenzeller BMR. (2023) Association between Environmental Exposure to Multiclass Organic Pollutants and Sex Steroid Hormone Levels in Women of Reproductive Age. *Environ Sci Technol.* 57(48):19383-19394.
16. Reale C, Invernizzi F, Panteghini C, Garavaglia B.J (2023). Genetics, sex, and gender. *Neurosci Res.* 101(5):553-562.
17. Rodriquez M, Aquino RP, D'Ursi AM. (2015). Is it time to integrate sex and gender into drug design and development? *Future Med Chem.* 7(5):557-9.
18. Schlünssen V, Jones RM. (2023) Gender aspects in occupational exposure and health studies. *Ann Work Expo Health.* 67(9):1023-1026.
19. Zucker I, Prendergast BJ. (2020) Sex differences in pharmacokinetic and adverse drug reactions in women. *Biol Sex Differ* 11(1):32.

Modelli QSAR e Approcci Read-Across: Strumenti Fondamentali per la Valutazione del Rischio

Omar Ben Mariem, Luca Palazzolo, Ivano Eberini

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

La valutazione del rischio si è tradizionalmente basata sull'utilizzo di grandi quantità di dati provenienti da test *in vitro* e *in vivo*. Negli ultimi decenni, considerazioni etiche riguardanti l'utilizzo di modelli animali di laboratorio hanno portato le autorità regolatorie in tutto il mondo a limitare sempre più questo approccio, promuovendo l'utilizzo di metodi alternativi. Questo aspetto è di particolare interesse nell'ambito dell'autorizzazione di prodotti cosmetici nell'Unione Europea, in cui l'uso di dati provenienti da nuovi esperimenti animali è stato vietato a partire dal 2013.

In questo contesto, è emersa l'importanza di nuove metodologie basate su metodi computazionali (*in silico*), quali modelli di Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR), e read-across. Queste metodologie possono essere utilizzate nell'ambito di un approccio "Weight of Evidence", in cui diverse fonti contribuiscono all'ottenimento della decisione finale sul rischio derivante dall'esposizione alla particolare

molecola di interesse.

I modelli QSAR sono costruiti con lo scopo di predire proprietà biologiche, chimiche, o tossicologiche di molecole in base alla loro struttura chimica, trasformando le proprietà delle molecole in valori numerici, chiamati descrittori molecolari. I modelli QSAR sono anche distinti sulla base dei set di molecole utilizzate per il loro sviluppo. In particolare, esistono modelli QSAR "locali", generati per una specifica classe di composti attraverso la caratterizzazione di un gruppo omogeneo e congenero di molecole e quindi utili nella predizione di proprietà di molecole simili, per le quali hanno generalmente prestazioni migliori. I modelli QSAR "globali", invece, sono costruiti utilizzando dei set di dati molto eterogenei, che permettono di coprire un campo di proprietà e meccanismi d'azione molto differenti. Questi modelli hanno solitamente prestazioni peggiori, ma permettono potenzialmente di fare nuove predizioni e/o scoperte.

Nel contesto della valutazione del rischio (risk assessment), sono stati sviluppati diversi modelli QSAR per predire la farmacocinetica e tossicocinetica di numerosi composti, la loro tossicità su specifici tessuti quali fegato e rene o specifici passaggi chiave di alcuni Adverse Outcome Pathways (AOP). Questi modelli possono essere utilizzati direttamente per ottenere un risultato valido ai fini regolatori in caso vengano ritenuti sufficientemente rilevanti. In altri casi, possono semplicemente supportare altri dati esistenti, fornendo informazioni sul meccanismo di azione della molecola, o guidare successive e necessarie strategie di valutazione. La validità e accuratezza dei modelli QSAR sono direttamente correlate con la qualità e la quantità dei set di dati utilizzati per la loro costruzione. Inoltre, ogni modello ha un dominio di applicabilità limitato allo scopo per cui è stato creato.

ECHA definisce un modello QSAR come “adeguato” se possiede tre proprietà fondamentali:

- il modello deve essere scientificamente valido. Questa proprietà deve seguire il principio della validazione statistica
- il modello deve essere applicabile alla molecola di interesse
- il modello deve essere rilevante ai fini regolatori, ovvero le informazioni ottenibili dal modello devono essere utilizzabili per guidare la decisione dell'ente regolatorio

Gli approcci read-across vengono utilizzati per predire proprietà ignote di una molecola, mutuandole dalle proprietà di una o più molecole analoghe. La selezione dei composti da cui estrarre le proprietà desiderate è il passaggio preliminare fondamentale per un read-across efficace. Al fine di identificare correttamente molecole adatte, si può utilizzare una combinazione di strumenti automatici che utilizzano indici di similarità molecolare (ad esempio il coefficiente di Tanimoto) e la valutazione

esperta. Data la natura del read-across, è consigliabile il suo utilizzo per endpoint più complessi, quali tossicità dose-ripetuta, clastogenicità, tossicità acuta, ecc.

In base al numero di molecole analoghe selezionate per il read-across, si può procedere con la valutazione utilizzando approcci “one-to-one”, o “analogue read-across”, in cui la predizione è compiuta basandosi sulle proprietà chimico-fisiche di una molecola simile, oppure approcci “many-to-one”, “N-to-one”, o “category approach”, in cui dati provenienti da più molecole sono utilizzati in contemporanea. Per entrambe le tipologie di read-across, tutti i dati rilevanti riguardanti le molecole scelte devono essere raccolti e valutati facendo particolare attenzione ad eventuali carenze o “data gap”. Nel caso alcuni dati mancanti vengano ritenuti essenziali per una corretta applicazione del read-across, si possono ottenere utilizzando altri metodi, ad esempio modelli QSAR, oppure decidere di ripetere la selezione degli analoghi.

QSAR e read-across sono diventati negli ultimi anni strumenti fondamentali nell'ambito delle metodologie innovative per la predizione di tossicità. Per questo motivo le autorità regolatorie hanno emanato numerose linee guida per armonizzare l'utilizzo di queste metodologie. La corretta applicazione di queste linee guida, accompagnata dall'aumento costante di dati con cui costruire e validare questi modelli, permettono già in gran parte e permetteranno sempre meglio di svolgere una corretta valutazione del rischio riducendo o eliminando la necessità di esperimenti *in vivo* e *in vitro*.

Il ruolo degli Adverse Outcome Pathways (AOPs) nella Tossicologia Moderna

Miriam Midali, Melania Serafini, Barbara Viviani

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

Il riconoscimento dei limiti intrinseci degli attuali test regolatori su modelli animali, spesso inadeguati per identificare aspetti cruciali legati all'insorgenza di malattie complesse, insieme all'obbligo etico di ridurre al minimo l'uso di animali nei test e alla grande quantità di sostanze chimiche che necessitano di valutazione, ha portato allo sviluppo di approcci alternativi, oggi supportati dai progressi tecnologici e da una comprensione sempre più approfondita dei meccanismi di tossicità. Gli "Adverse Outcome Pathways" (AOPs) rientrano in questo contesto e sono parte di un programma lanciato dall'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) che faciliti l'integrazione di dati in silico, in vitro, in vivo e di studi osservazionali sull'uomo in un unico quadro identificato con il termine di "Integrated Approaches to Testing and Assessment" (IATA).

Struttura degli AOPs: Dall' Evento Iniziale all'Esito Avverso ed organizzazione in AOP networks (AOPN)

Un AOP è composto da una serie di **Eventi Chiave** (Key Events, KEs) linearmente e causalmente connessi attraverso delle **Key Event Relationships**, (KERs). I KEs originano da un **Evento Iniziale** a livello **Molecolare** (Molecular Initiating Event, MIE), si sviluppano attraverso livelli biologici di complessità crescente e portano ad un **Esito Avverso** (Adverse Outcome, AO), per la salute o per l'ecosistema, di rilevanza regolatoria (Fig. 1). Attraverso questo schema un AOP (i) definisce la plausibilità biologica degli eventi osservati, (ii) favorisce l'integrazione di informazioni provenienti da diverse fonti necessaria a valutare la qualità dei dati, la coerenza dei risultati, la natura e la gravità degli effetti, dando un peso dell'evidenza a supporto di un quesito regolatorio e (iii) assembla gli approcci metodologici più adatti a misurare ciascun evento.

L'analisi dettagliata di questi modelli permette di identificare non solo specifici punti di intervento, ma anche lacune nei dati

esistenti, facilitando così la progettazione di strategie di valutazione mirate.

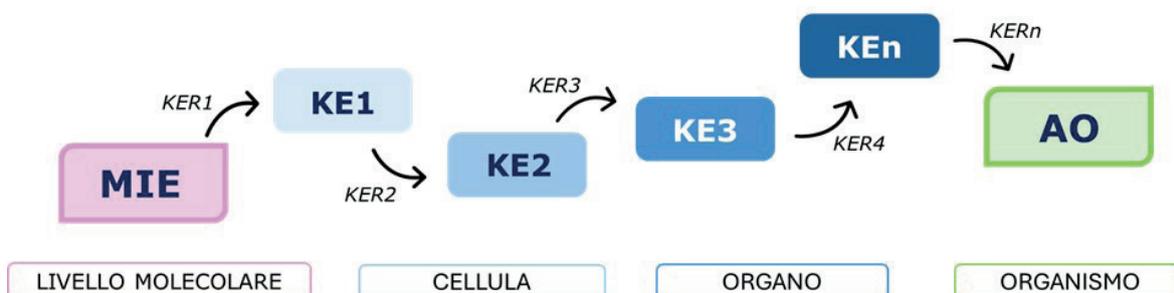


Fig. 1 - Rappresentazione schematica di un Adverse Outcome Pathway.

Ad oggi, alcuni degli AOP più sviluppati sono stati organizzati in Network (AOPN: AOP che condividono uno o più MIE, KE, AO) e analizzati al fine di identificare le KE più connesse e studiarle per descrivere meglio la complessità dei processi biologici.

L'AOP nella Valutazione del Pericolo e del Rischio

Gli AOP sono progettati per facilitare l'adozione di un approccio meccanicistico negli studi normativi ed epidemiologici che identificano un possibile legame tra l'esposizione a sostanze chimiche (ad esempio, pesticidi) e l'insorgenza di patologie complesse, difficili da studiare nei modelli animali.

Tutti gli AOP sviluppati vengono inseriti in AOP-Wiki, un grande database di raccolta promosso da OCSE, responsabile della loro adozione dopo un processo di revisione indipendente. Ad ogni AOP viene assegnato un ID in modo tale da renderlo facilmente rintracciabile.

L'organizzazione di AOP lineari in network e la loro analisi ha permesso l'identificazione di meccanismi biologici comuni a più AOP, evidenziando bersagli critici e facilitando il raggruppamento di sostanze chimiche con modalità d'azione simili. Gli AOPN forniscono inoltre indicazioni su quali test dare priorità, a supportare l'identificazione di

biomarcatori e a fornire un approccio alla modellazione di AOP quantitativi (qAOP) che possono rispondere a domande specifiche sul grado di perturbazione necessario per causare l'insorgenza di effetti avversi.

Agenzie regolatorie, quale l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, hanno promosso lo sviluppo di diversi AOPs. Tra questi due esempi interessanti sono l'AOP 442 (Binding to VGSC during development leads to cognitive function decrease) nell'ambito della neurotossicità dello sviluppo e l'AOP 3 (Inhibition of the mitochondrial complex I of nigrostriatal neurons leads to Parkinsonian motor deficits), sviluppato per valutare l'evidenza alla base di un possibile legame meccanicistico tra l'esposizione ai pesticidi e l'aumento del rischio di malattia di Parkinson. Questi AOPs, di cui il #3 approvato dall'OECD, hanno fornito una base solida per lo sviluppo di strategie di valutazione nel contesto del Regolamento Europeo per i Pesticidi 283/2013 e 1107/2009. Inoltre, la comprensione del meccanismo ha aumentato la capacità di interpretare gli studi osservazionali sull'uomo, definendo un collegamento plausibile a un AO rilevante per l'uomo e quindi facilitando la contestualizzazione di questi studi in un futuro processo di valutazione del rischio.

Sfide e Prospettive Future

Nonostante i numerosi vantaggi offerti dagli AOPs, ci sono ancora alcune sfide da affrontare. Molti AOP presenti su AOP-Wiki, ad esempio, sono ancora incompleti o mancano di informazioni dettagliate, limitando il loro uso immediato in contesti normativi. Tuttavia, il continuo sviluppo e l'aggiornamento di questi modelli promettono di superare questi limiti, rendendo gli AOPs uno strumento sempre più potente nella tossicologia moderna.

Gli AOP, quindi, rappresentano una svolta fondamentale nella comprensione dei meccanismi di tossicità, fornendo un quadro strutturato e scientificamente valido per la valutazione del pericolo ed a supporto della valutazione del rischio.

Siti e letture consigliate

1. *OECD Series on Adverse Outcome Pathways*. SSN: 2415170X (online). https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-adverse-outcome-pathways_2415170x
2. *Adverse Outcome Pathways*: <https://www.oecd.org/en/topics/sub-issues/testing-of-chemicals/adverse-outcome-pathways.html>
3. *AOP-wiki*: <https://aopwiki.org/>
4. *AOP network*: D. Knapen, M.M. Angrish, M.C. Fortin, I. Katsiadaki, M. Leonard, L. Margiotta-Casaluci, S. Munn, J.M. O'Brien, N. Pollesch, L.C. Smith, X. Zhang, D.L. Villeneuve. *Adverse outcome pathway networks I: Development and applications*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37(6) (2018) 1723-1733. <https://doi.org/10.1002/etc.4125>
5. *Casi studio: OECD 2022 IATA 363 Case study for the integration of in vitro data in the developmental neurotoxicity hazard identification and characterisation using flufenacet*. [https://one.oecd.org/document/env/cbc/mono\(2022\)25/en/pdf](https://one.oecd.org/document/env/cbc/mono(2022)25/en/pdf)
6. M. Alimohammadi, B. Meyburg, A.K. Ückert, A.K. Holzer, M. Leist. *EFSA Pilot Project on New Approach Methodologies (NAMs) for Tebufenpyrad Risk Assessment. Part 2. Hazard characterisation and identification of the Reference Point*. *EFSA supporting publication EN-7794*. (2023) 56 pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.EN-7794>

Tutti i modelli sono sbagliati, ma alcuni sono utili

Luca Palazzolo, Ivano Eberini

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

I modelli PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetic*) sono strumenti matematici multi-compartimentali che simulano i processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME) di composti chimici, utilizzando dati fisiologici e biochimici. La loro complessità varia in base alla natura del problema, partendo da approcci semplici fino a modelli più sofisticati che rappresentano in modo dettagliato le interazioni fisiologiche e anatomiche del corpo. Questi modelli sono oggi ampiamente utilizzati per prevedere le proprietà farmacocinetiche (PK) di xenobiotici, permettendo di rispondere a domande cruciali come: “*Quale sarà la concentrazione di un composto in un determinato organo nel tempo?*” o “*Come si può adattare il dosaggio di un farmaco quando si passa dai modelli animali di laboratorio agli esseri umani?*”

Una delle loro applicazioni più promettenti è nell’ambito dei Nuovi Metodi Alternativi (NAM), che mirano a ridurre l’impiego di

test *in vivo* e a migliorare la valutazione del rischio attraverso metodologie *in vitro* e *in silico*. I modelli PBPK, in questo contesto, forniscono un supporto cruciale per prevedere come una sostanza si distribuisca nel corpo umano e quale possa essere il suo impatto tossicologico. Grazie alla loro capacità di integrare dati sperimentali *in vitro* e simulare la biocinetica umana, i modelli PBPK migliorano la valutazione del rischio con un approccio più etico, efficace e accurato.

Un esempio significativo dell’uso dei modelli PBPK nei NAM è la loro integrazione con i percorsi di esito avverso (AOP). Questa combinazione consente una previsione quantitativa della tossicità a livello molecolare e cellulare, partendo dal primo evento molecolare (MIE) fino agli effetti avversi. Utilizzando dati fisiologici e biochimici, quali la distribuzione tissutale e il legame del composto a proteine e lipidi, i modelli PBPK forniscono una stima accurata della concentrazione di un composto

in organi specifici, migliorando la capacità di valutare i rischi a lungo termine per la salute umana. Questo approccio è particolarmente utile per sostanze chimiche che possono accumularsi nel tempo e causare danni solo dopo esposizioni prolungate.

Nonostante i numerosi vantaggi, sviluppare modelli PBPK richiede tempo e risorse, poiché devono essere considerati numerosi parametri fisiologici e biochimici che possono variare tra le specie, tra gli individui, e in base alle caratteristiche specifiche del composto chimico in esame. Tuttavia, grazie all'integrazione delle tecnologie di apprendimento automatico e intelligenza artificiale, è possibile automatizzare e ottimizzare molti aspetti della costruzione di questi modelli, accelerando così lo sviluppo di modelli PBPK robusti, anche con dati sperimentali limitati.

I modelli PBPK possono rappresentare esplicitamente diversi organi attraverso compartimenti. La scelta del numero di compartimenti e della loro complessità dipende dall'obiettivo dello studio, dal composto chimico in esame e dalla via di somministrazione. Solitamente, i compartimenti includono organi chiave come fegato, reni, cuore e cervello. Attraverso equazioni differenziali, si possono stimare le variazioni di concentrazione di un composto nel tempo nei diversi tessuti, permettendo di prevedere la distribuzione e l'eliminazione del composto dall'organismo. Ad esempio, un modello specifico per il cervello può includere la barriera ematoencefalica, importante per la distribuzione di farmaci destinati al trattamento di malattie neurologiche. Questa accuratezza si rivela particolarmente utile nei NAM, dove le simulazioni devono tenere conto di dettagli fisiologici specifici per sostituire i test sugli animali e fornire previsioni attendibili.

Grazie alla loro capacità di integrare dati sperimentali *in vitro* e simulazioni *in silico*,

i modelli PBPK sono un pilastro essenziale nel contesto dei NAM. Forniscono una base solida per l'estrapolazione dei dati *in vitro* all'ambiente *in vivo* (IVIVE), rappresentando accuratamente la cinetica e la dinamica di sostanze chimiche all'interno del corpo umano.

Un caso studio, per esempio, illustra come i modelli PBPK siano stati utilizzati per prevedere le concentrazioni di sostanze chimiche durante lo sviluppo fetale, un'area particolarmente sensibile dove i test sugli animali sono problematici e l'accuratezza delle previsioni è fondamentale per proteggere la salute delle popolazioni più vulnerabili. Inoltre, l'uso dei modelli PBPK nel combinare dati dose-risposta con AOP anche in sistemi biologici complessi offre nuove opportunità per migliorare la comprensione dei meccanismi alla base delle malattie e per sviluppare migliori strumenti predittivi per la tossicologia.

Ad oggi, i modelli PBPK offrono un approccio flessibile e altamente adattabile che, combinato con l'intelligenza artificiale e l'apprendimento automatico, promette di trasformare il modo in cui vengono condotti gli studi di farmaco- e tossico-cinetica. I modelli PBPK sono sempre più usati dalle agenzie regolatorie, come FDA ed EMA, che li hanno applicati per valutare l'efficacia e la sicurezza di nuovi farmaci e che ne riconoscono il valore aggiunto nella valutazione del rischio e nella determinazione dei dosaggi ottimali. Tuttavia, rimangono aperte le sfide per ottenere dati sufficientemente accurati per stimare tutti i parametri richiesti. Per questo motivo, è importante che i modelli siano ben giustificati e documentati, con un'analisi dettagliata delle equazioni utilizzate.

I modelli PBPK rappresentano quindi uno strumento chiave per i NAM, facilitando la riduzione dell'uso di metodi tradizionali basati su modelli *in vivo* e contribuendo a una scienza più avanzata, etica e accurata nella valutazione del rischio chimico e farmacologico.

Immagine di copertina

Dea Igea, figlia di Asclepio e di Lampeggia, venerata come dea della salute. Veniva raffigurata ora sotto l'aspetto di una giovane donna prosperosa nell'atto di dissetare un serpente, ora seduta con la mano sinistra appoggiata a un'asta, mentre con l'altra mano porge una patera a un serpente che, lambendola, si innalza da un'ara posta davanti a lei.

Il culto era associato a quello del padre e di Panacea, sua sorellastra. Oltre che dea della salute (o del risanamento in generale), era la divinità di ogni cosa pulita. A differenza del padre, direttamente e unicamente associato alla cura delle malattie, Igea veniva invece associata alla prevenzione dalle malattie e al mantenimento dello stato di salute.

La presenza del serpente è dovuta al fatto che gli antichi attribuivano al rettile intelligenza e sentimenti particolari: suscitava grande impressione per la vita misteriosa e sotterranea, per la capacità di discernere veleni mortali, per la grande velocità, nonché per l'abilità nell'ipnotizzare le prede. Il serpente è comunque legato da sempre al mondo della farmacologia: il suo veleno, in minime dosi, rappresentava spesso l'unico rimedio contro moltissime malattie.

I frammenti in cui è scomposta l'immagine rappresentano uno specchio che riflette le diverse sfaccettature della nostra disciplina (ambientale, clinica, preclinica, ecc.).



Siamo lieti di informarvi che SITOX è operativa anche sui principali canali social: Facebook e Twitter

Potete seguire le nostre attività su questi canali:

Facebook: <https://www.facebook.com/societa.tossicologia.sitox/>

Twitter: <http://twitter.com/sitoxita>

Vi chiediamo di sostenere le attività di comunicazione di SITOX, mettendo mi piace alla pagina Facebook, seguendo il profilo Twitter e ricondividendo i post che ritenete interessanti per i vostri contatti, in modo da ottenere maggior visibilità per le attività di comunicazione della Società.

Il Giornale Italiano di Tossicologia è scaricabile online.

Visita il nostro sito www.sitox.org