



# Additività di dose: criteri per l'applicazione

Francesca Metrucchio

*International Centre for Pesticides and Health Risk Prevention  
ASST Fatebenefratelli Sacco*



# Indice

- Il progetto Euromix
- Le miscele
- Grouping
- Lo studio sulle malformazioni cranio-facciali



# Indice

- Il progetto Euromix
- Le miscele
- Grouping
- Lo studio sulle malformazioni cranio-facciali



*A tiered strategy for risk assessment of mixtures of multiple chemicals*

## 22 istituti europei

- 10 laboratori
- Esperti di bioinformatica
- Esperti di valutazione del rischio
- Agenzie nazionali di sicurezza alimentare

Fondi europei 8M €  
4 anni (2015-2019)

## Revisori:

- World Health Organization (WHO)
- US-EPA
- Health Canada
- University of Brasilia





*A tiered strategy for risk assessment of mixtures of multiple chemicals*

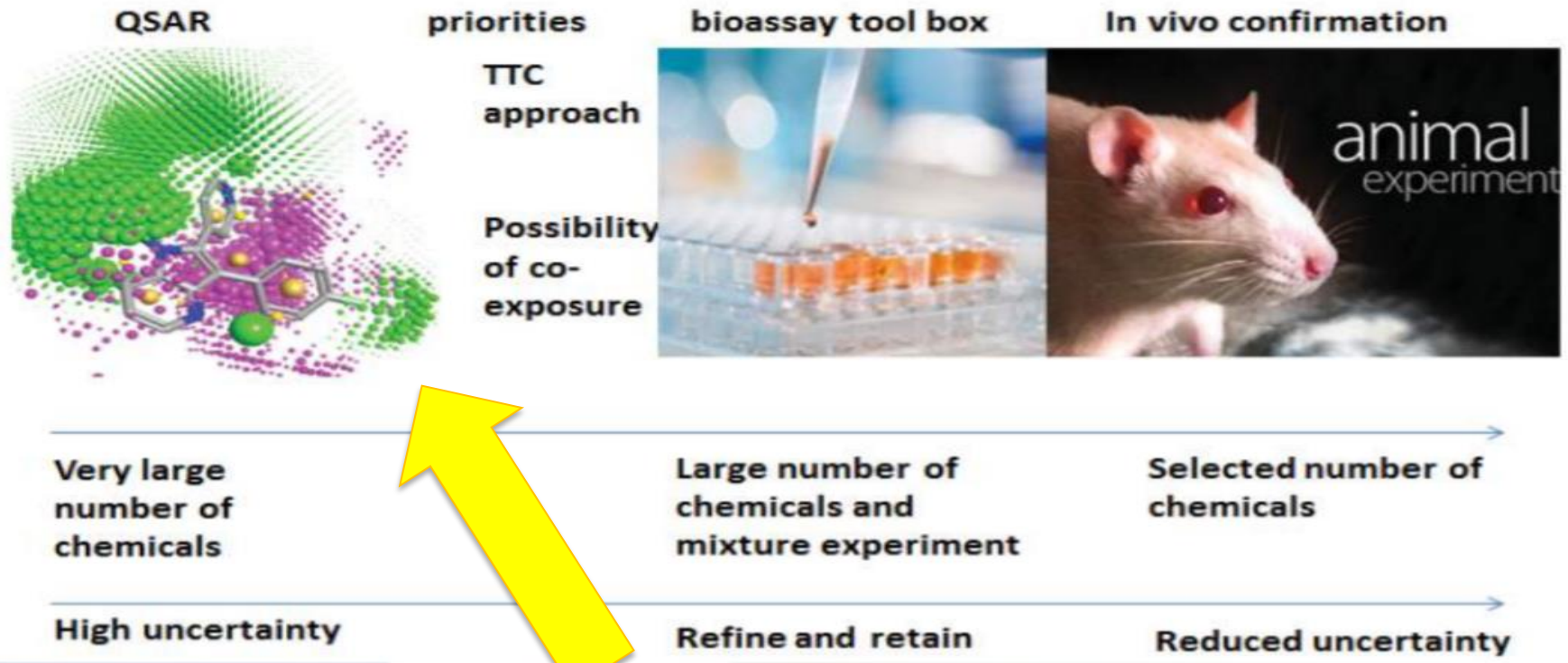
## Scopo del progetto

Sviluppare una strategia per valutare gli effetti delle miscele anche attraverso tecniche innovative.

Sviluppare una strategia per la valutazione del rischio dell'esposizione a miscele.



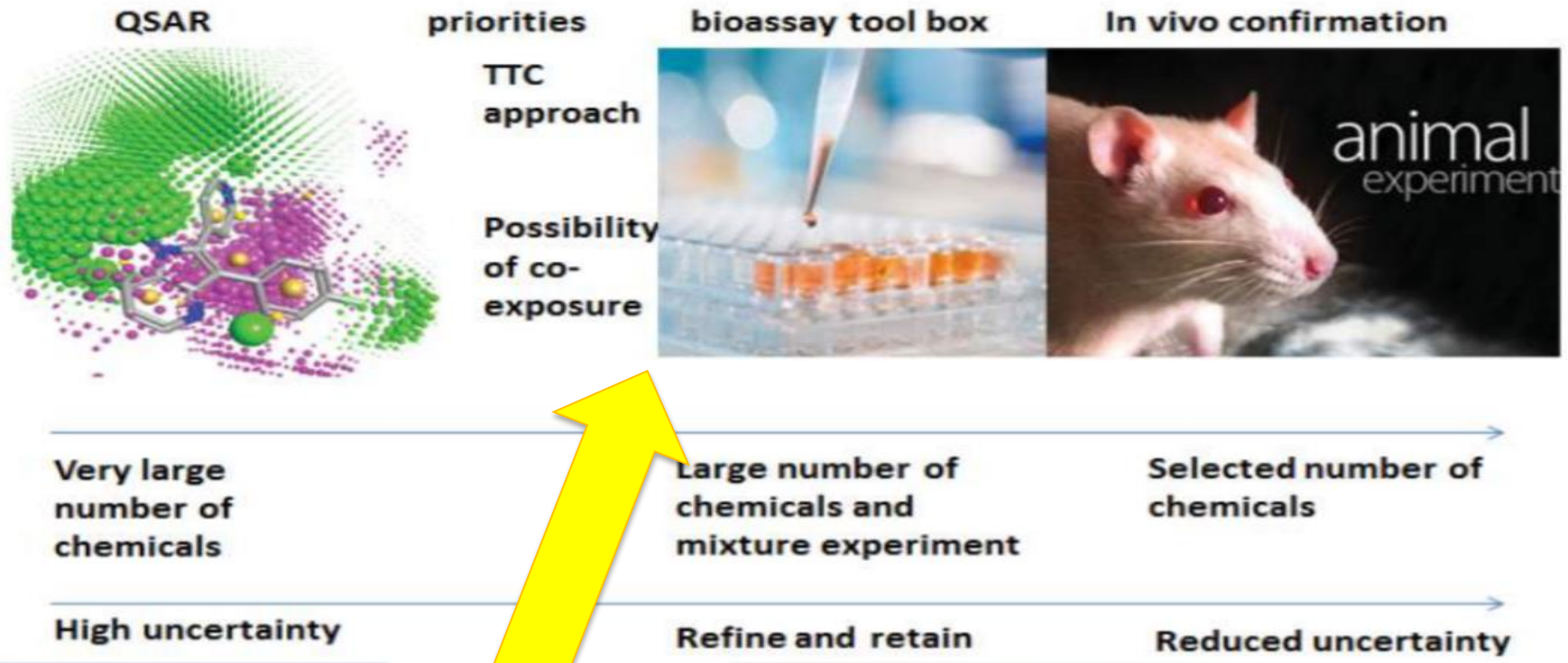
# EuroMix testing strategy



la modellazione in silico, per raggruppare le sostanze chimiche in gruppi di valutazione cumulativa in assenza di dati dettagliati sulla tossicità e per stabilire le priorità dei test.



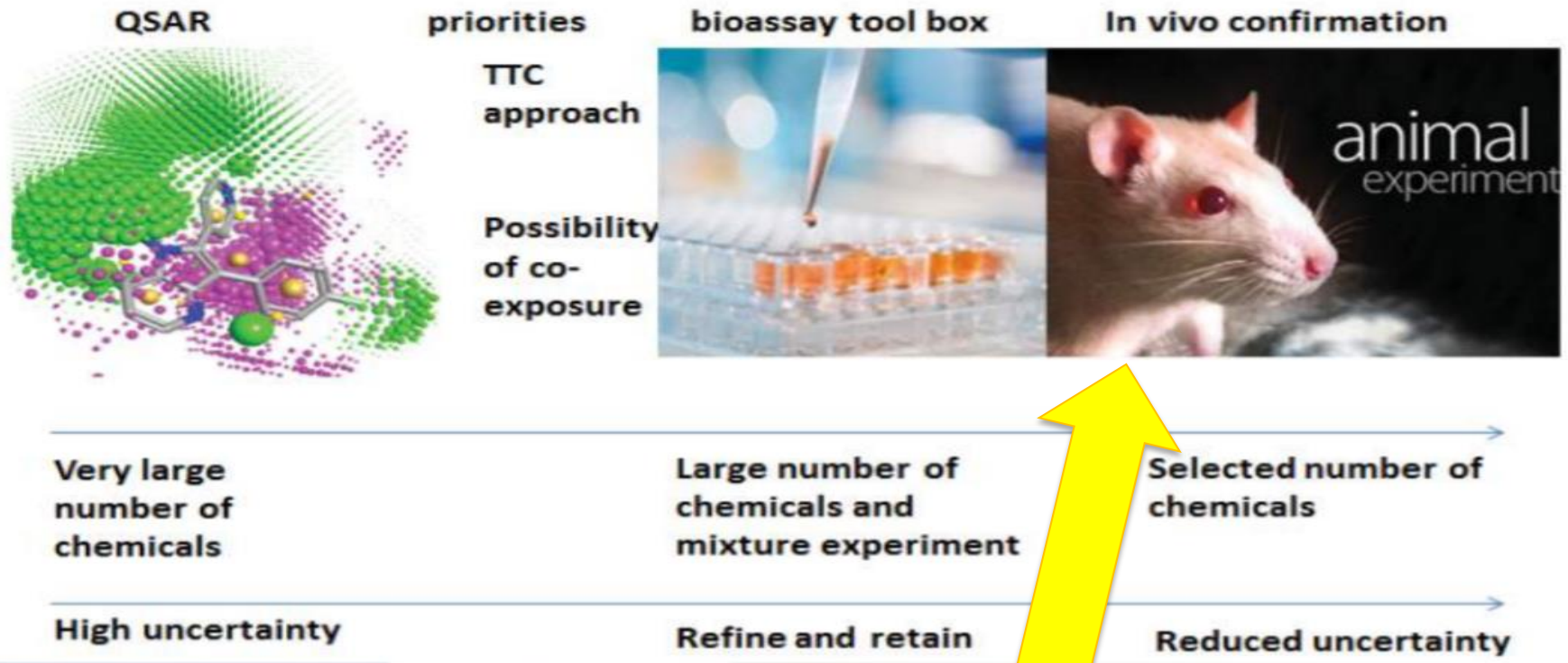
# EuroMix testing strategy



saggi in vitro su diverse sostanze (simili/dissimili) per studiare l'adeguatezza delle ipotesi sul meccanismo d'azione e ricavare la potenza relativa di ciascuna sostanza chimica in una miscela.



# EuroMix testing strategy



I risultati dei test in vitro vengono poi confrontati con i dati degli studi sugli animali





# Indice

- Il progetto Euromix
- **Le miscele**
- Grouping
- Lo studio sulle malformazioni cranio-facciali



# Miscela: Approccio basato sui componenti della miscela

**RAGGRUPPARE I componenti in Cumulative assessment group (QSAR, molecular docking, AOP)**

**previsione matematica dell'effetto combinato dei diversi componenti della miscela**



L'assunzione generale di partenza è che due o più sostanze presenti nella miscela non interagiscano.

L'effetto combinato della miscela può quindi esser previsto secondo l'ipotesi dell'additività

L'ipotesi dell'additività può essere smentita dall'evidenza di una interazione che provoca un effetto superiore (sinergismo) o inferiore (antagonismo) a quello previsto sotto la prima ipotesi

A	=	10	Effetto additivo
B	=	10	A+B= 20
C	=	20	A+C= 30

Antagonismo	Sinergismo
A+B = 15	A+B = 27



# Indice

- Il progetto Euromix
- Le miscele
- **Grouping**
- Lo studio sulle malformazioni cranio-facciali



# Grouping

EFSA ha raggruppato le sostanze chimiche in Cumulative Assessment Groups (CAG)s

Level 1: organ level  
Level 2: phenomenological endpoints

- Adrenal gland
- Eye
- Gallbladder
- Liver
- Nervous system
- Parathyroid gland
- Reproductive system
- Developmental toxicity
- Thyroid

EFSA website

1 tier

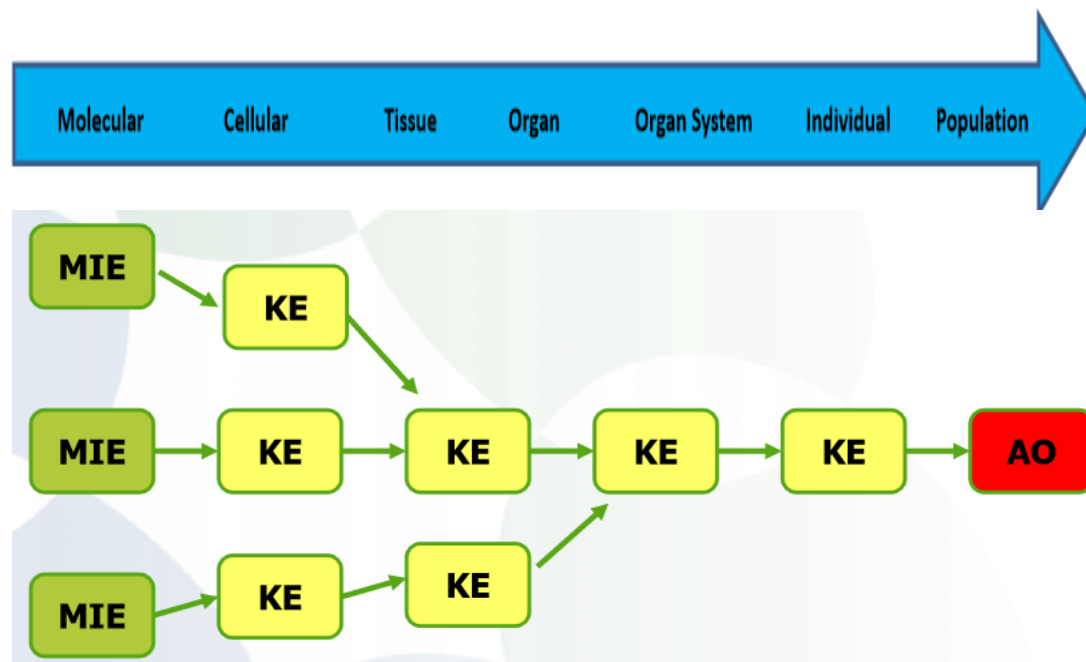
# AOP

integrazione dei dati ottenuti a livello molecolare e cellulare, con gli effetti ottenuti in vivo in organi, apparati e organismi

Può essere utilizzato come base per raggruppare le sostanze e contemporaneamente identificare gli opportuni test in vivo

Gli eventi di cui si compone devono essere osservabili, misurabili ed essenziali per il procedere dell'effetto fino all'AO

approccio modulare descrive il procedere dell'effetto avverso a prescindere dalla sostanza che provoca il **MIE** (Molecular Initiating Events) per svilupparsi attraverso i differenti **KE** (Key Events) ed arrivare all'**AO** (Adverse Outcome)



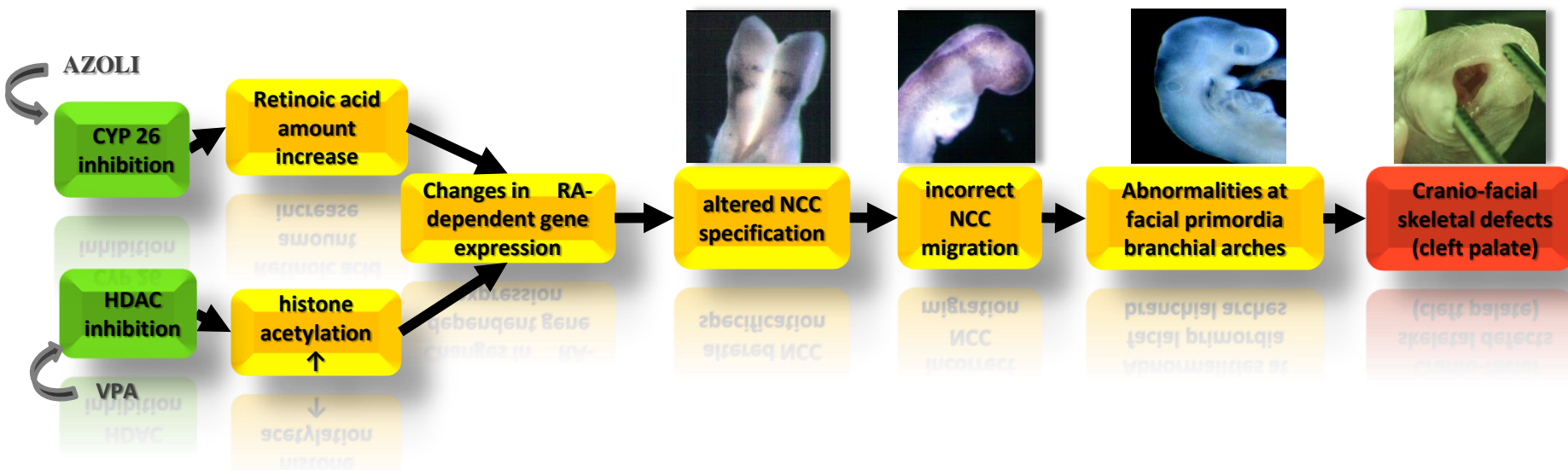


# Indice

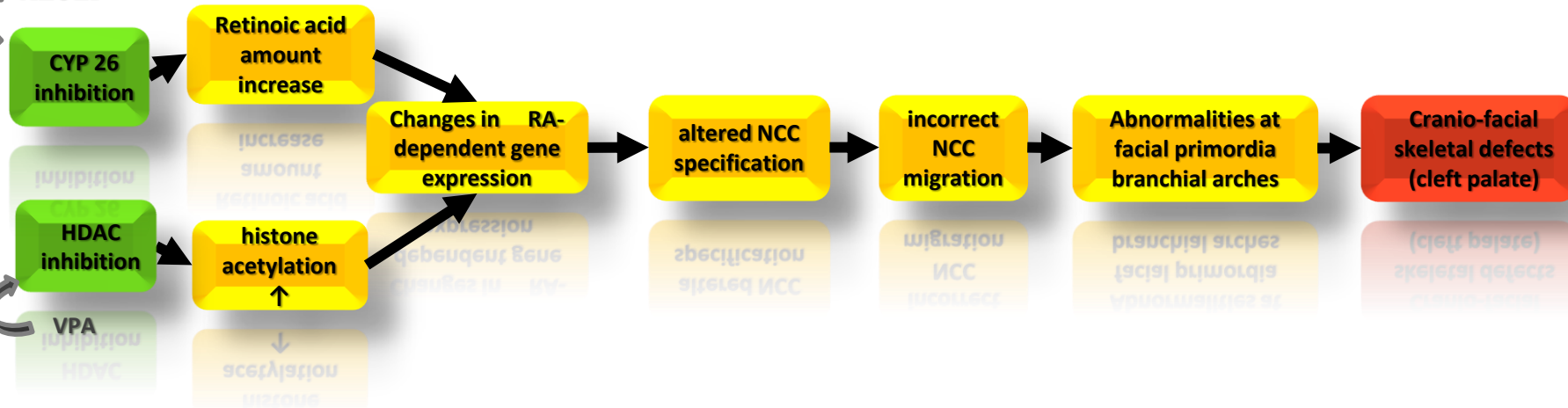
- Il progetto Euromix
- Le miscele
- Grouping
- Lo studio sulle malformazioni cranio-facciali

# Lo studio

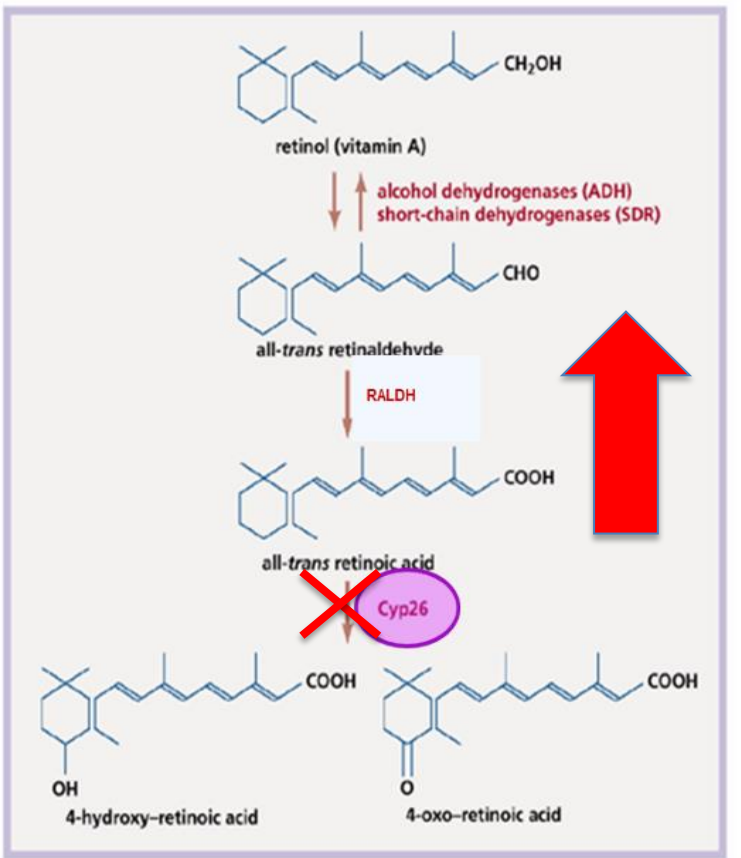
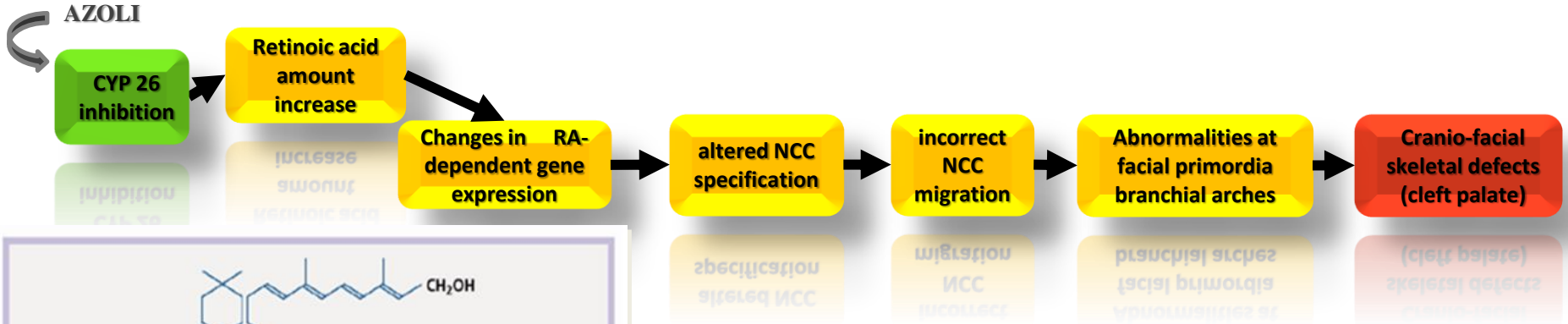
valutare, con diversi modelli sperimentali, gli effetti dismorfogenici (modellati attraverso il software PROAST 62.5 ) di miscele sia di molecole che condividono lo stesso MIE (ciproconazolo, CYPRO, e triadimefon, FON) che di molecole con MIE potenzialmente differente (CYPRO e VPA) e confluenti però nello stesso AOP.



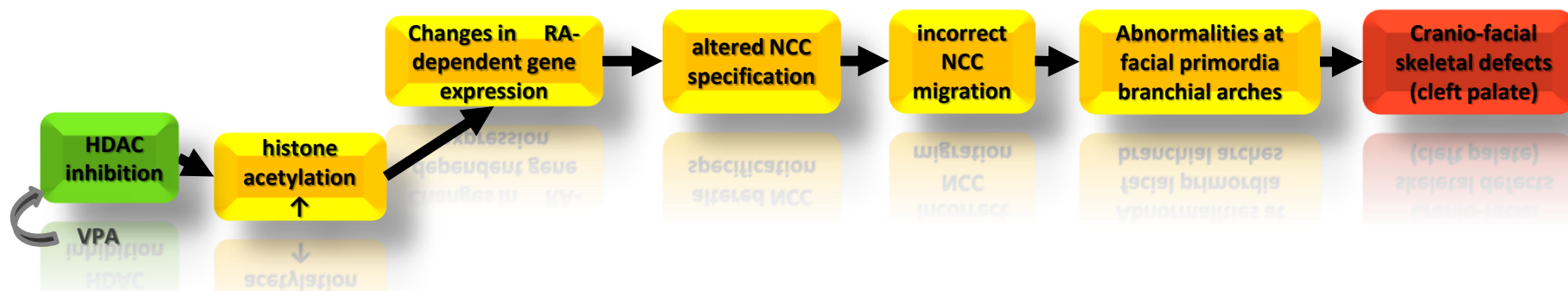
AZOLI



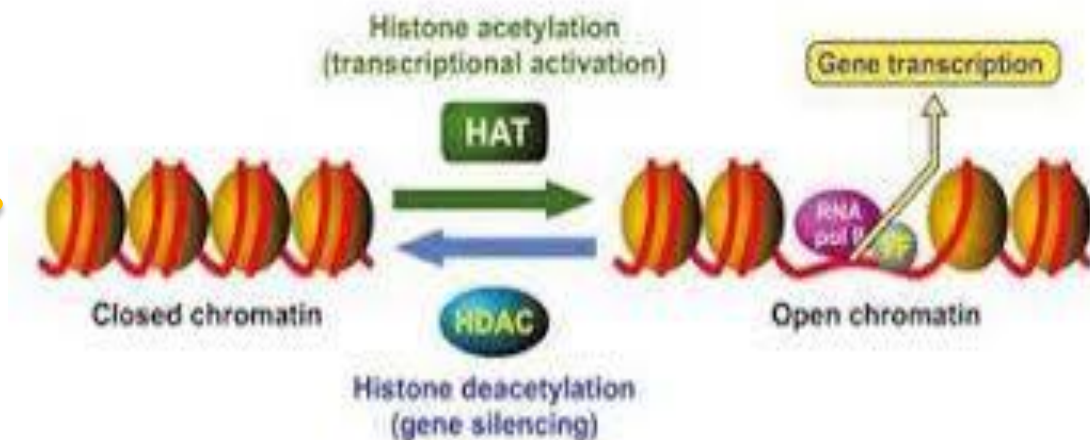




Per i fungicidi azolici il MIE proposto è l'inibizione dell'enzima Cyp26 responsabile del catabolismo dell'acido retinoico (AR). Il conseguente aumento locale della concentrazione di AR potrebbe portare ad una serie di eventi responsabili dell'insorgenza di malformazioni cranio-facciali



Per il VPA il MIE proposto è l'inibizione delle istone deacetilasi con conseguente cambiamento conformazionale della cromatina e aumento della trascrizione di geni RA dipendenti



# METODI

## *In vitro (WEC)*

Embrioni di ratto espantati al 9.5° giorno *post coitum* sono stati esposti *in vitro* per 48 ore a singoli composti CYPRO, FON, VPA o a miscele binarie di questi.

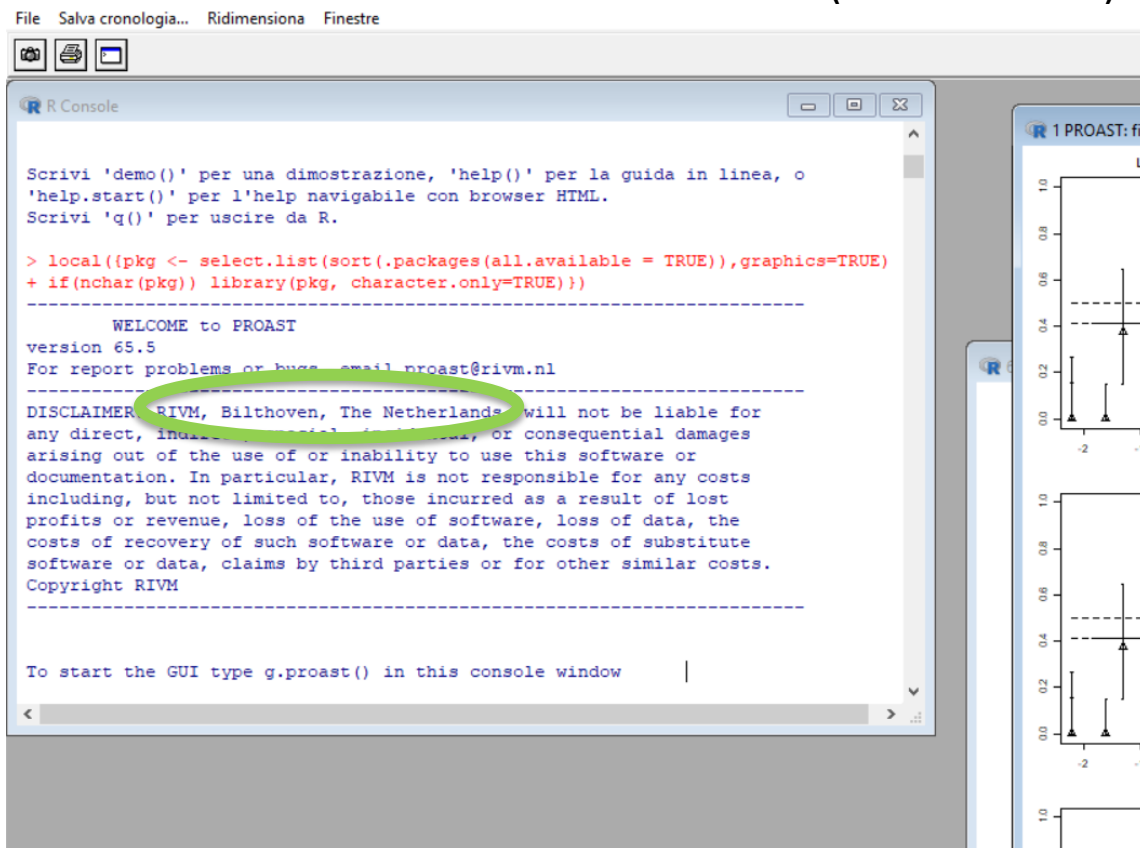


Femmine di topo CD1 sono state trattate all'8° giorno post coitum con i singoli composti CYPRO, FON, VPA o con miscele



# PROAST

I dati ottenuti dall'esposizione in vivo ed in vitro sono stati analizzati tramite il software PROAST (versione 65.5)



```
File Salva cronologia... Ridimensiona Finestre
[Icons]
R Console
Scrivi 'demo()' per una dimostrazione, 'help()' per la guida in linea, o
'help.start()' per l'help navigabile con browser HTML.
Scrivi 'q()' per uscire da R.

> local((pkg <- select.list(sort(.packages(all.available = TRUE)),graphics=TRUE)
+ if(nchar(pkg)) library(pkg, character.only=TRUE)))

-----
WELCOME to PROAST
version 65.5
For report problems or bugs_email proast@rivm.nl
-----
DISCLAIMER RIVM, Bilthoven, The Netherlands will not be liable for
any direct, indirect, or consequential damages
arising out of the use of or inability to use this software or
documentation. In particular, RIVM is not responsible for any costs
including, but not limited to, those incurred as a result of lost
profits or revenue, loss of the use of software, loss of data, the
costs of recovery of such software or data, the costs of substitute
software or data, claims by third parties or for other similar costs.
Copyright RIVM
-----

To start the GUI type g.proast() in this console window
```

RIVM

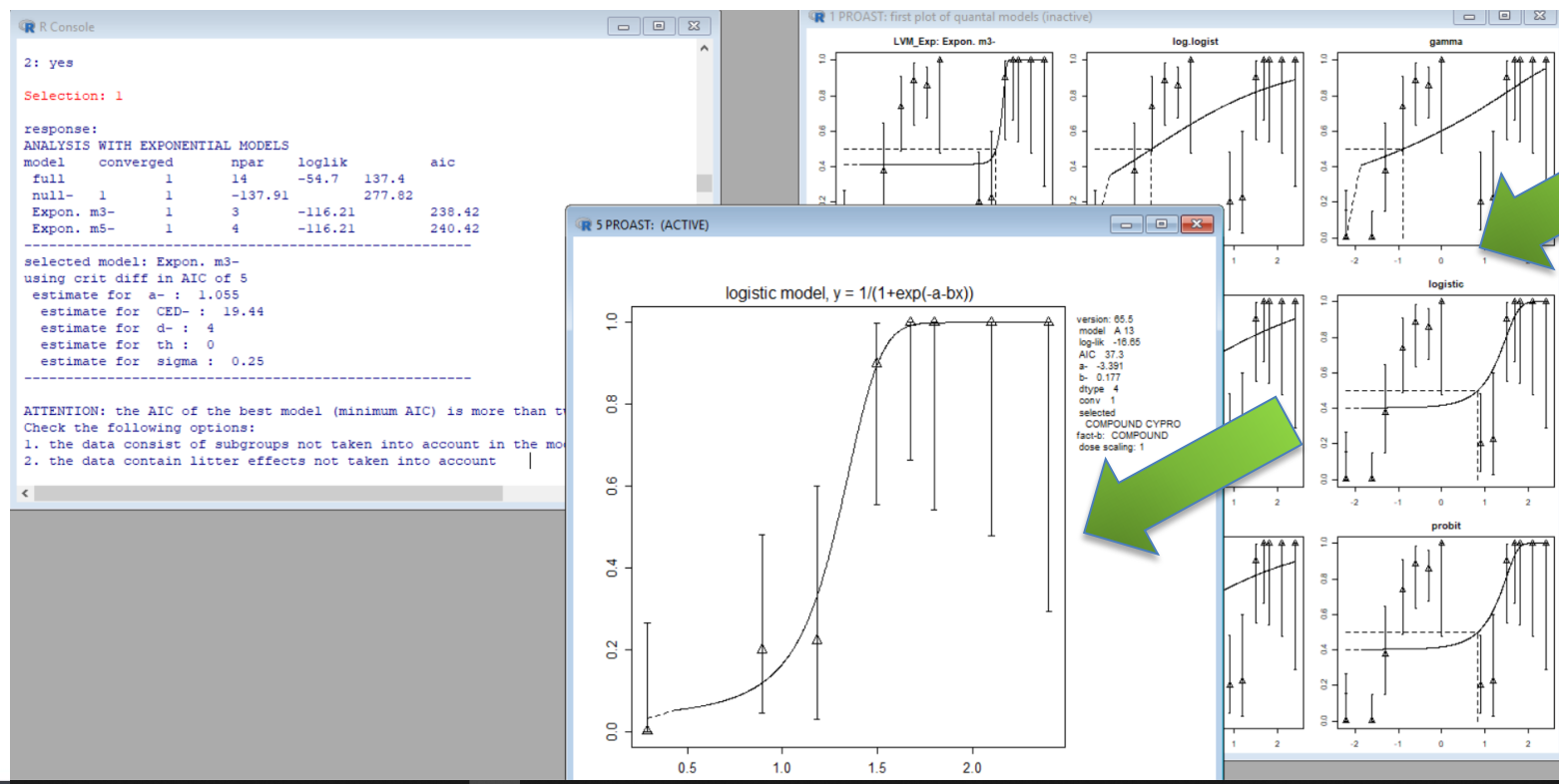


National Institute for Public Health  
and the Environment  
Ministry of Health, Welfare and Sport

# PROAST

Il software permette di :

modellare I dati sperimentali ed ottenere le curve dose risposta secondo la metodica BMD (benchmark dose)



# PROAST

Il software permette di :

calcolare le potenze relative delle sostanze rispetto ad una sostanza indice

```
R Console

Scrivi 'demo()' per una dimostrazione, 'help()' per la guida in linea, o
'help.start()' per l'help navigabile con browser HTML.
Scrivi 'q()' per uscire da R.

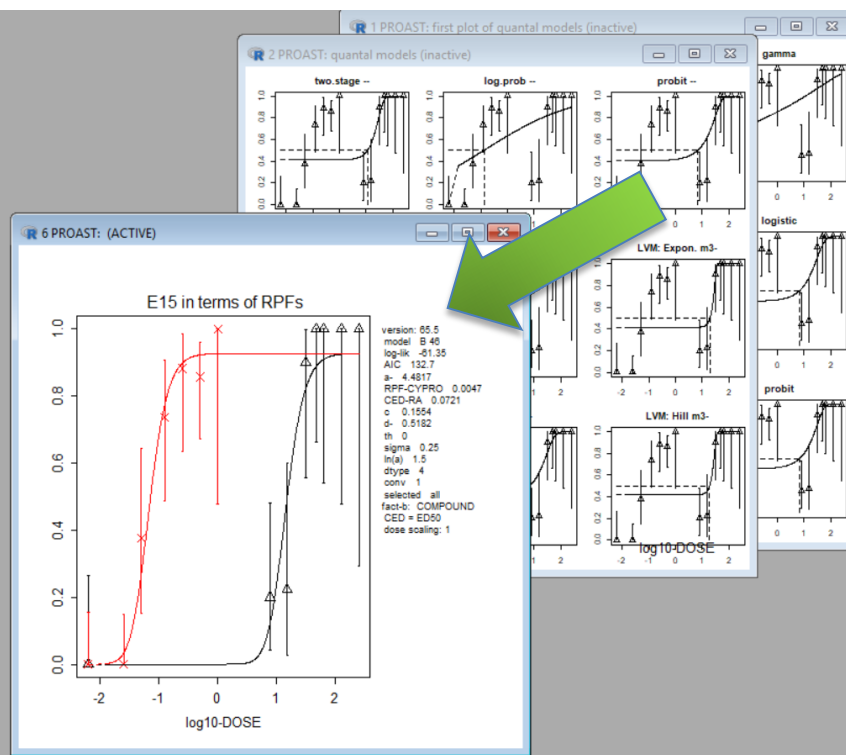
> local((pkg <- select.list(sort(.packages(all.available = TRUE)),graphics=TRUE)
+ if(nchar(pkg)) library(pkg, character.only=TRUE)))

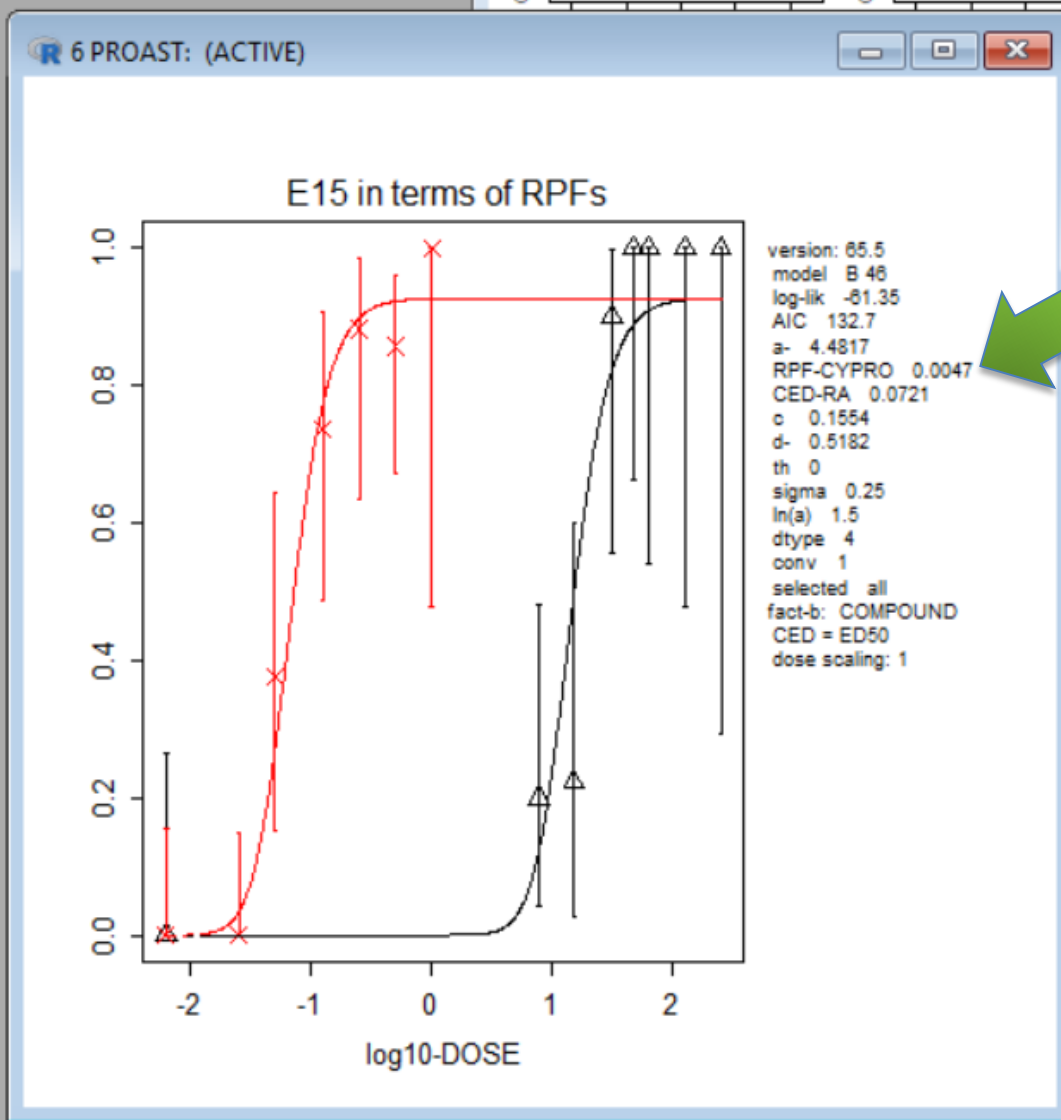
-----
WELCOME to PROAST
version 65.5
For report problems or bugs, email proast@rivm.nl

-----
DISCLAIMER: RIVM, Bilthoven, The Netherlands, will not be liable for
any direct, indirect, special, incidental, or consequential damages
arising out of the use of or inability to use this software or
documentation. In particular, RIVM is not responsible for any costs
including, but not limited to, those incurred as a result of lost
profits or revenue, loss of the use of software, loss of data, the
costs of recovery of such software or data, the costs of substitute
software or data, claims by third parties or for other similar costs.
Copyright RIVM

-----

To start the GUI type g.proast() in this console window
```

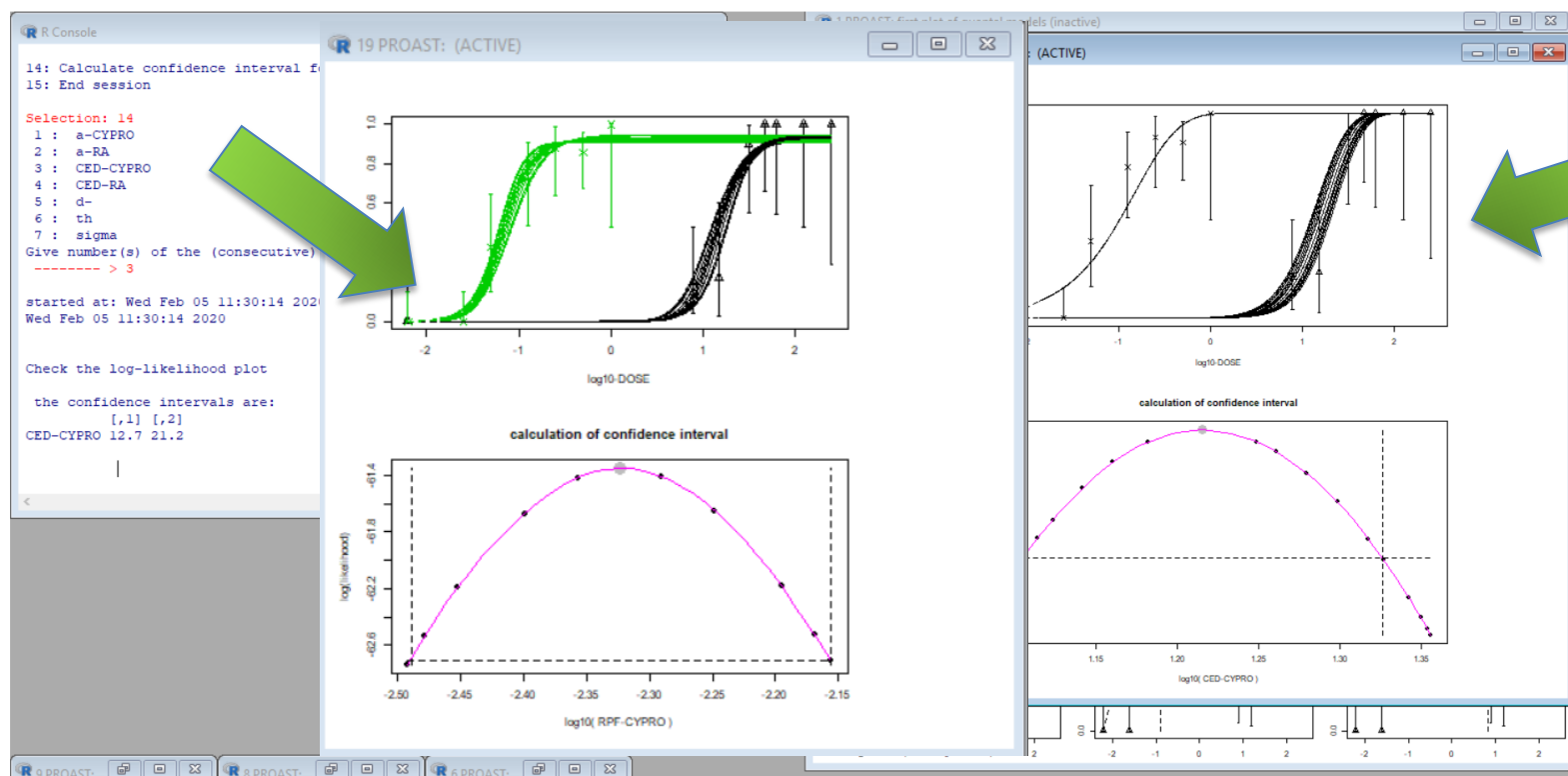




# PROAST

Il software permette di :

Applicare test statistici per verificare la plausibilità dell'ipotesi (effetto additivo?)





Fase 1

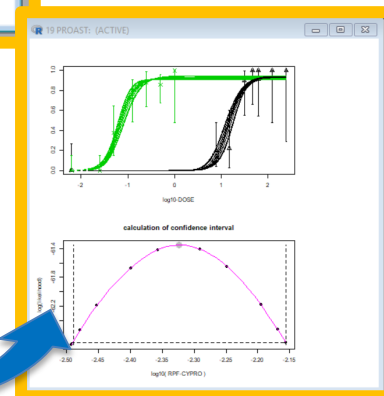
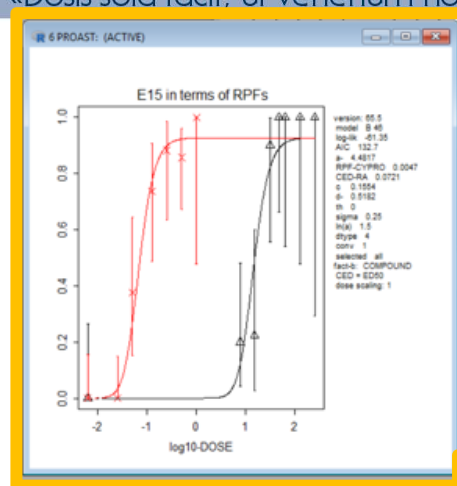
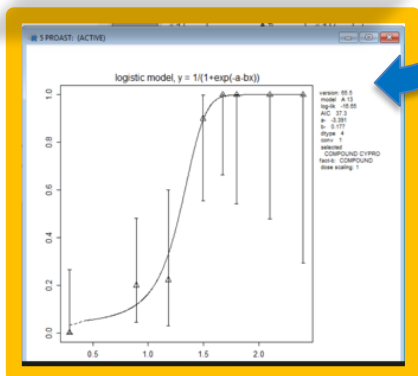
Modellare i dati dose-risposta della singola sostanza fissando BMR al 50%

Scegliere il composto indice della miscela

Ricavare RPF dei composti rispetto al composto indice

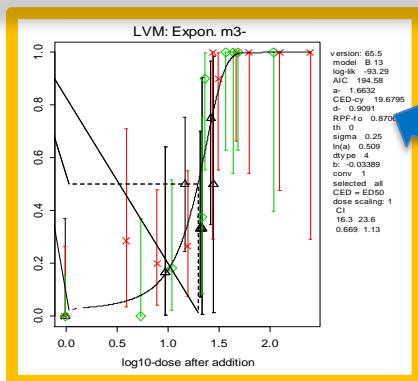
Ricavare gli intervalli di confidenza degli RPF

Verificare il parallelismo delle curve dose risposta mediante il log-likelihood ratio test

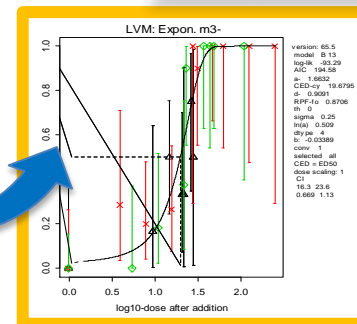


```
R Console
>
> z.F(-108.23, -110.36, 4)
[1] 0.37196
> |
```

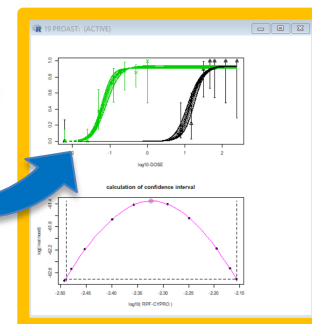
Modellare in un'unica analisi i dati delle singole sostanze e i dati dose risposta delle miscele



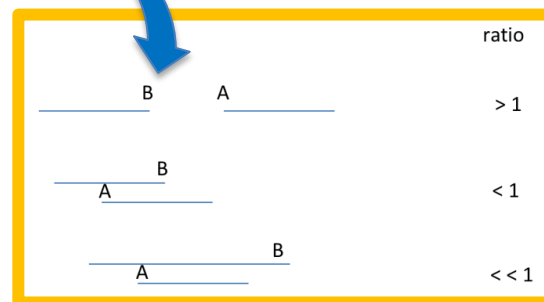
Ricavare RPF dei composti nell'analisi combinata



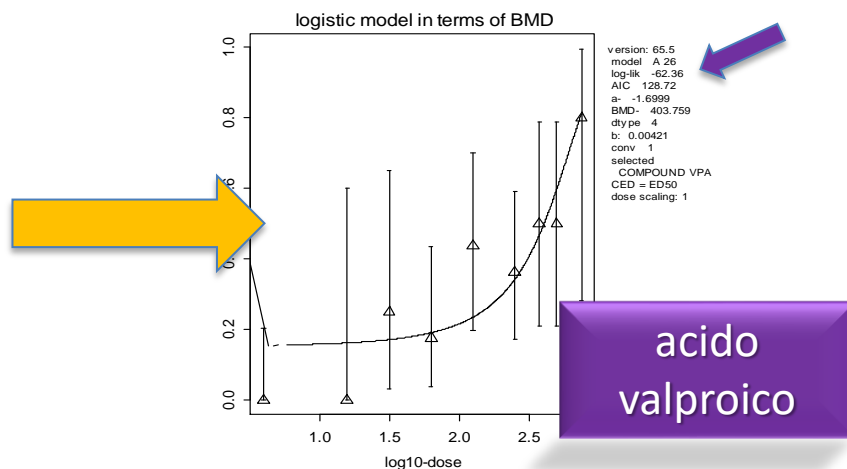
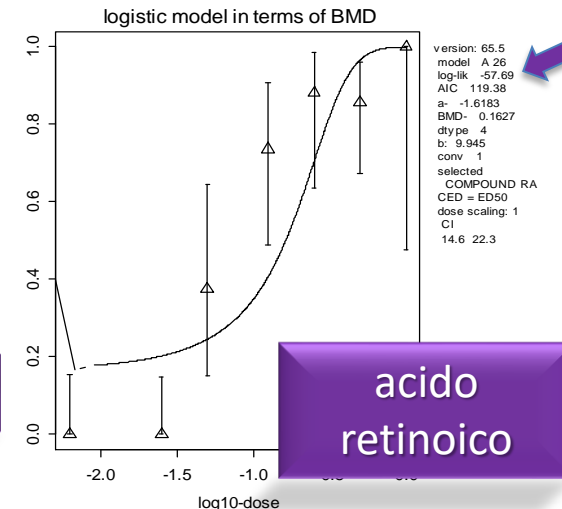
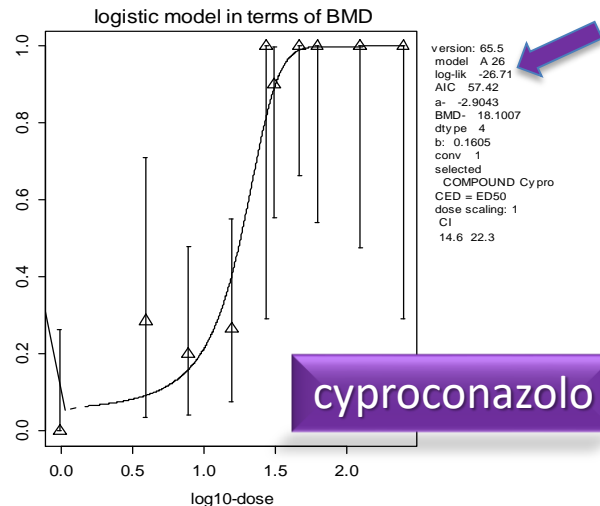
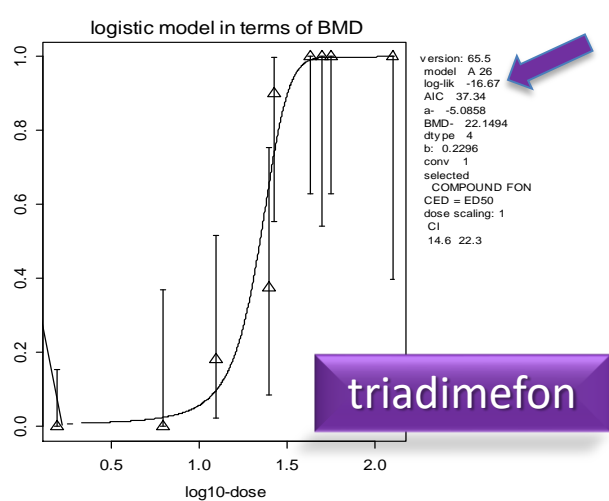
Ricavare gli intervalli di confidenza degli RPF nell'analisi combinata



Il risultato dell'analisi è compatibile con l'additività di dose se gli intervalli di confidenza degli RPF ottenuti mediante analisi dei singoli data set, si sovrappongono agli intervalli di confidenza degli RPF ottenuti mediante analisi combinata dei singoli e della miscela

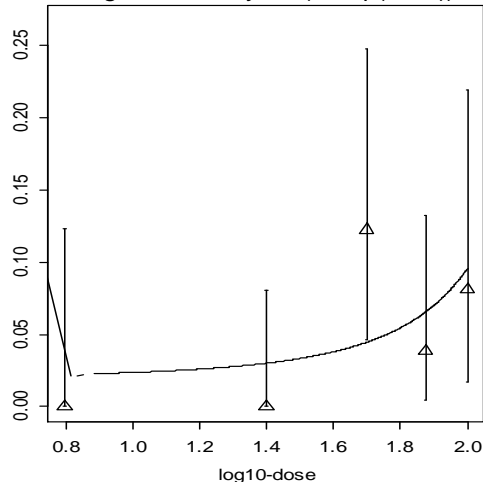


# PROAST (vitro) singoli componenti



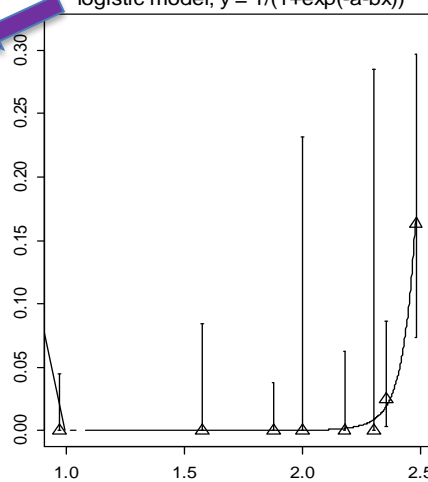
# PROAST (vivo) singoli componenti

logistic model,  $y = 1/(1+\exp(-a-bx))$



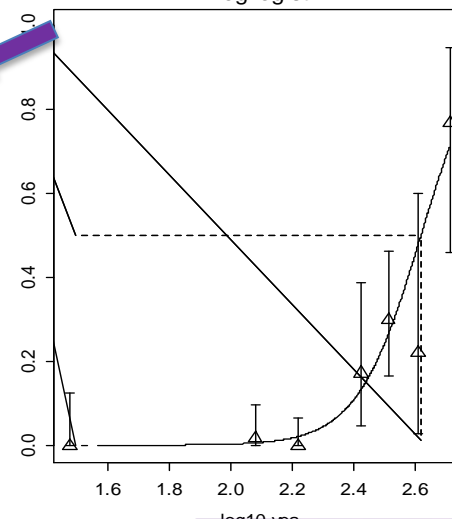
cyprocoanzolo

logistic model,  $y = 1/(1+\exp(-a-bx))$



triadimefon

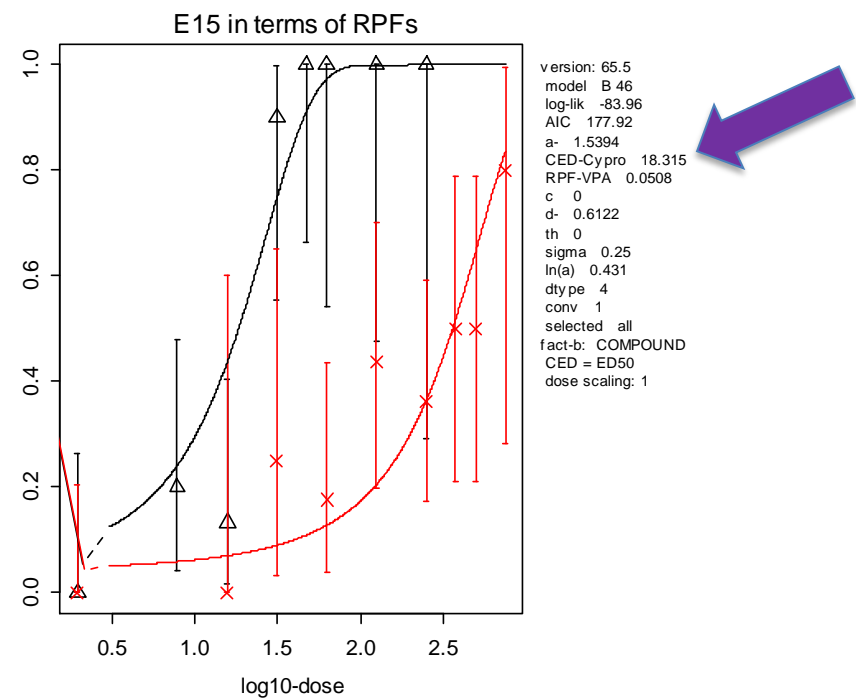
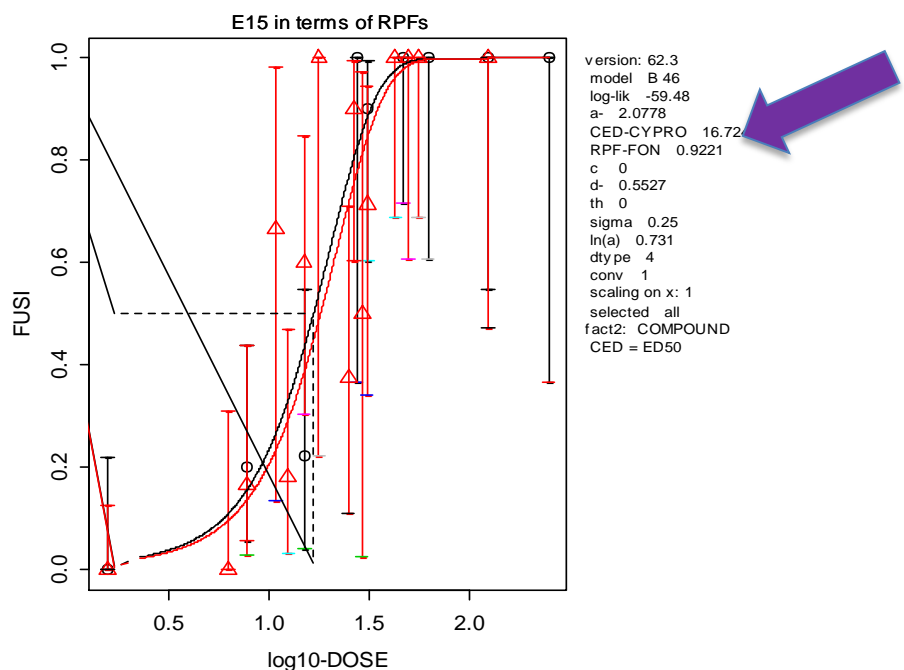
log.logist



Acido valproico

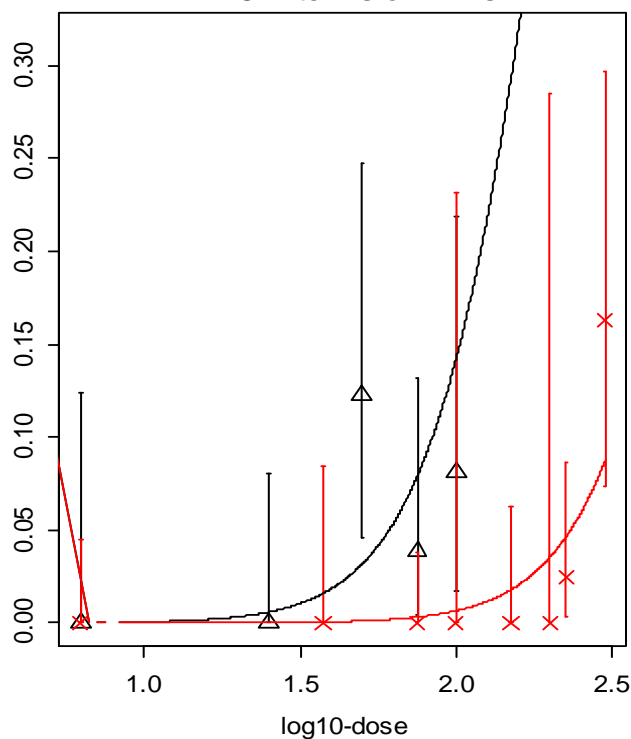


# PROAST (vitro) calcolo RPF

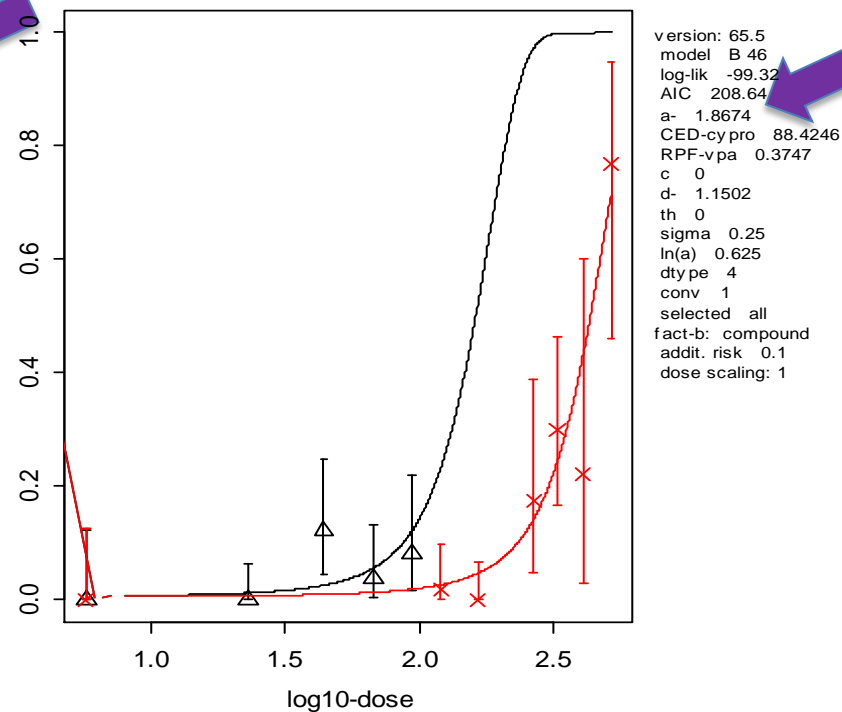


# PROAST (vivo) calcolo RPF

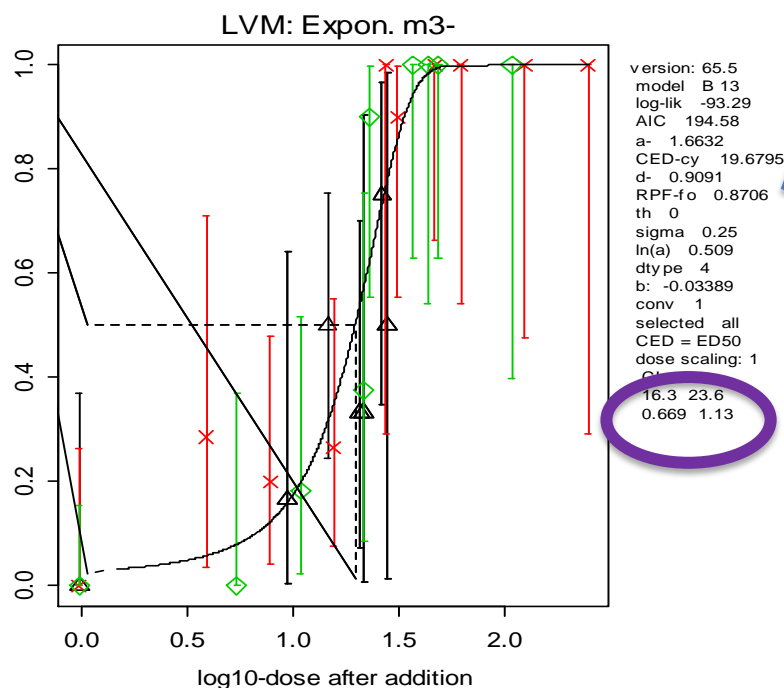
E15 in terms of RPFs



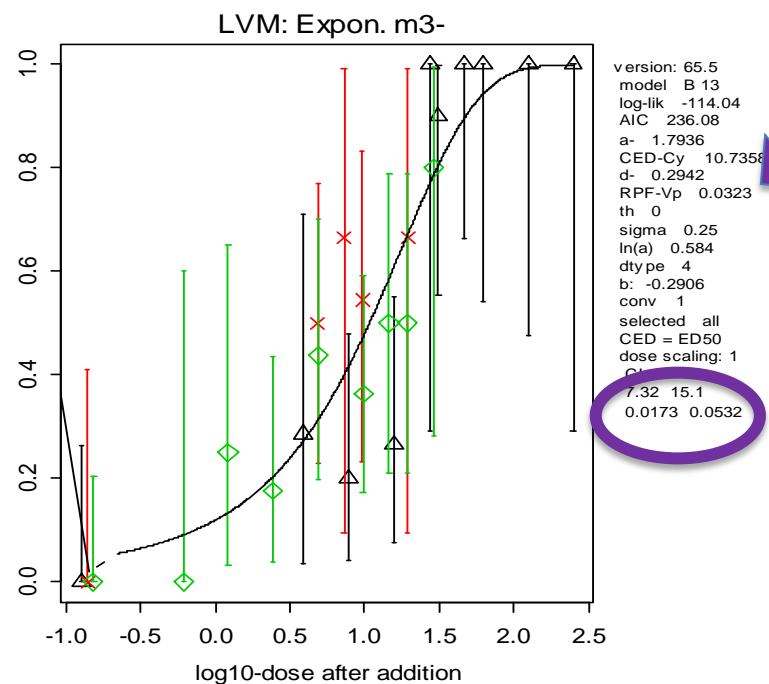
E15 in terms of RPFs



# PROAST (vitro) analisi combinata singoli + miscela

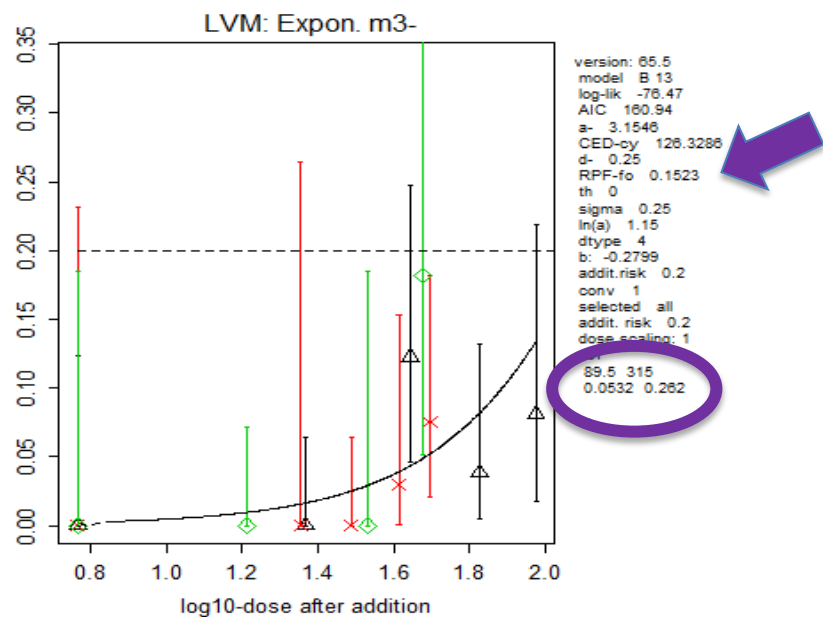


Triadimefon +  
cyproconazolo

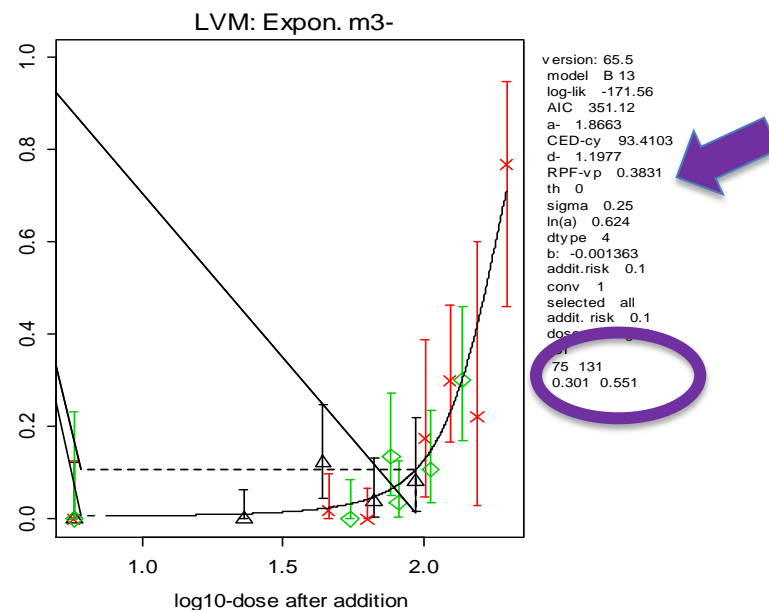


Acido valproico  
+ cyproconazolo

# PROAST (vivo) analisi combinata singoli + miscela



Triadimefon +  
cyproconazolo

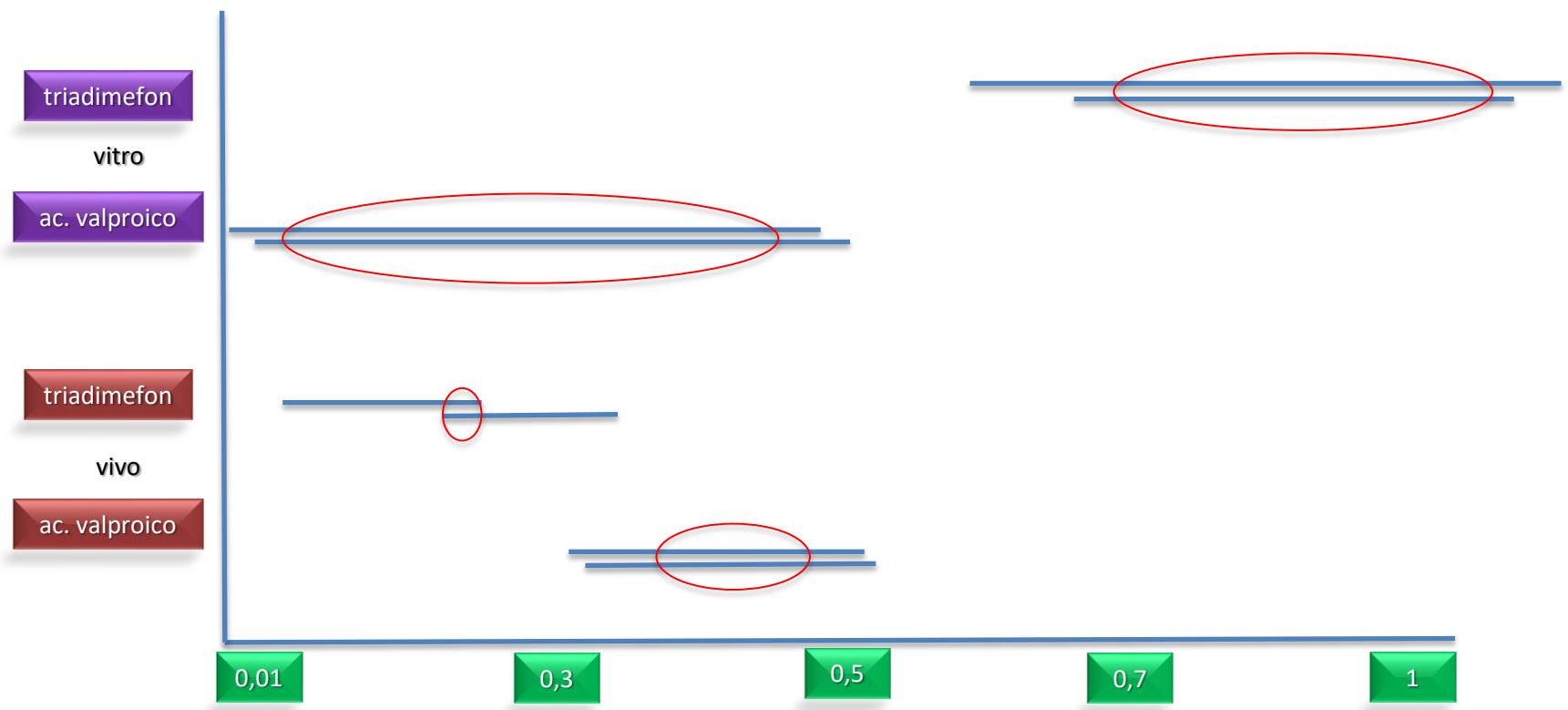


Acido valproico  
+ cyproconazolo





# Confronto RPF (CI)





# Conclusioni

I dati ottenuti sono compatibili con l'ipotesi dell'additività sia per miscele di molecole che condividono lo stesso MIE (fungicidi azolici) che per miscele di molecole con MIE differenti.

Inoltre i risultati dello studio suggeriscono come il metodo WEC possa costituire un metodo in vitro predittivo alternativo applicabile per la valutazione del rischio dell'esposizione a miscele.



# Ringraziamenti

Angelo Moretto

Elena Menegola

Francesca Di Renzo