
Le miscele dei fitofarmaci: implicazioni per la valutazione del rischio sanitario

Annamaria Colacci
CTR CAVR
ARPA-Emilia Romagna

Miscela complesse

■ Miscela

- Combinazione di due o più componenti a cui un organismo vivente è esposto
 - Simultaneamente
 - Es. PCB
 - Sequenzialmente
 - Un intero pranzo

Miscela complesse e ambiente

- ...ovvero del superamento dell'approccio tossicologico:



La complessa pratica del risk assessment di miscele

■ Rischio cumulativo

- Derivante da più contaminanti nella stessa matrice
 - Possibilità di effetto avverso da esposizione da tutte le fonti di esposizione a un gruppo di sostanze che condividono lo stesso meccanismo d'azione

■ Rischio aggregato

- Derivante dallo stesso contaminante in più matrici
 - Possibilità di effetto avverso da esposizione allo stesso principio da più fonti

Si può predire l'effetto di una miscela?

- Due approcci fondamentali
 - Additività della dose (Loewe additivity)
 - Tossicità in funzione e proporzionale alla dose
 - Sostanze con uguale tossicocinetica e tossicodinamica
 - Interazione tra le sostanze minima
 - Additività dell'effetto (Bliss independence)
 - Stima indipendente dell'effetto atteso per una specifica concentrazione di ogni singolo componente. Somma totale degli effetti
 - Sostanze con diversa tossicocinetica e tossicodinamica
 - Ogni sostanza esercita un effetto indipendentemente dalle altre componenti

Additività della dose e fitofarmaci (Deneer, 2000)

- Endpoint
 - Tossicità acquatica
- Filogenesi
 - Alghe, invertebrati, pesci
- Data base
 - 26 studi
 - 202 miscele
- Risultati
 - 90% dei dati concordano su un effetto additivo
 - Deviazioni generalmente dovute alla presenza di esteri organofosforici, carbamati e piretroidi sintetici

Additività dell'effetto e fitofarmaci: l'approccio di US-EPA

■ Approccio

□ common mechanism group

- Raggruppamento di composti sulla base della struttura, delle proprietà tossicologiche e/o fitofarmacologiche
- Definizione del meccanismo d'azione per uno o più componenti del gruppo (candidate substance)
- Caratterizzazione degli altri composti del gruppo sulla base del peso dell'evidenza nell'attribuzione delle medesime caratteristiche strutturali, tossicologiche e dei dati di farmacocinetica e farmacodinamica e nell'identificazione di un comune meccanismo d'azione

(Guidance for Identifying Pesticide Chemicals and Other Substances That Have A Common Mechanism of Toxicity)

Modo d'azione vs meccanismo d'azione

■ Meccanismo d'azione

- Sequenza di eventi molecolari dall'assorbimento di una sostanza (dose efficace) alla produzione di una risposta biologica specifica

■ Modo d'azione

- Evidenze fisiologiche e comportamentali che caratterizzano una risposta biologica indesiderata
 - Una risposta biologica può dipendere da più meccanismi

L'approccio US-EPA e il caso delle triazine

■ Composti

- ❑ atrazina, simazina, propazina, tribenuron-metile (Express),
- ❑ 2-idrossiatrazina, desetil-s-atrazina (DEA), desisopropil-s-atrazina (DIA), diaminoclorotriazina (DACT)

■ Endpoint

- ❑ Tumore delle ghiandole mammarie nel ratto

■ Meccanismo d'azione

- ❑ Effetto di interferenza endocrina sull'asse ipotalamo - ipofisi - gonadi con incremento della produzione di estrogeni e di prolattina

L'approccio US-EPA e il caso delle triazine

- Candidate compound
 - atrazina,
- Composti correlati (common mechanism group)
 - simazina, propazina, desetil-s-atrazina (DEA), desisopropil-s-atrazina (DIA), diaminoclorotriazina (DACT)
- Risultato
 - Additività di effetto

Possibili interazioni fra i componenti di miscele appartenenti allo stesso gruppo di meccanismo d'azione

| MSCELA | Possibili effetti derivanti dalle interazioni |
|---|---|
| 2 sostanze | |
| TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| ATRAZINA TERBUTILAZINA | additivi |
| ATRAZINA-DESETIL TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| ATRAZINA ATRAZINA-DESETIL | additivi |
| ATRAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| | |
| 3 Sostanze | |
| ATRAZINA-DESETIL TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| ATRAZINA ATRAZINA-DESETIL TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| ATRAZINA TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| ATRAZINA SIMAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| 4 Sostanze | |
| ATRAZINA ATRAZINA-DESETIL TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| ATRAZINA SIMAZINA TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |
| ATRAZINA ATRAZINA-DESETIL SIMAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | additivi |

Possibili interazioni fra i componenti di miscele appartenenti allo stesso gruppo di meccanismo d'azione

| Miscela | Possibili effetti derivanti dalle interazioni |
|---|---|
| 2 Sostanze | |
| METOLACLOR TERBUTILAZINA | additivi |
| TERBUTILAZINA-DESETIL TIOBENCARB | additivi |
| 3 Sostanze | |
| METOLACLOR TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | Additivi/più che additivi? |
| ATRAZINA METOLACLOR TERBUTILAZINA | Additivi/più che additivi? |
| 4 Sostanze | |
| ATRAZINA-DESETIL METOLACLOR TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | Additivi/più che additivi? |
| ATRAZINA METOLACLOR TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | Additivi/più che additivi? |
| METOLACLOR OXADIAZON TERBUTILAZINA TERBUTILAZINA-DESETIL | più che additivi? |

Aspetti critici di una miscela ambientale

- Effetto matrice
 - Fattori biotici e abiotici modificanti la tossicità
 - Approccio conservativo
- Effetti ambientali e climatici
 - Stagionalità
 - Piovosità
 -cambiamenti climatici
- Caratterizzazione chimica

Troviamo ciò che cerchiamo

Aspetti critici di una miscela ambientale: il rischio aggregato

Ambiente indoor casa

Occupazionale e ambiente indoor di lavoro

Medicinali per uso umano e veterinario

Alimentazione



Attività ricreative

Necessità e ipotesi di lavoro

■ Necessità

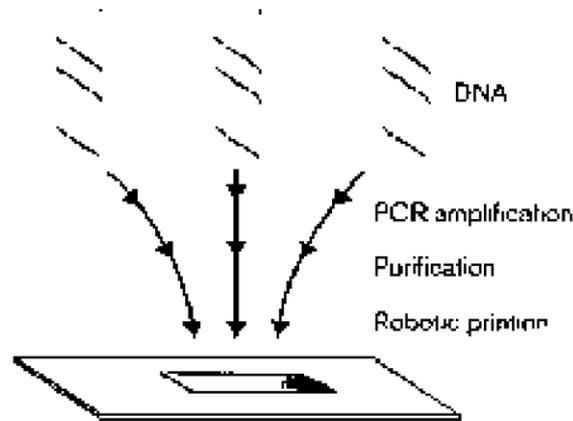
- Strumenti veloci e altamente predittivi per incrementare il data base di tossicità
- Strumenti sensibili e specifici per identificare effetti e meccanismi d'azione

Microtox : un esempio di strumento rapido per endpoint di tossicità acuta

- Microtox
 - Test standardizzato, rapido, sensibile, riproducibile, economico
 - Usato per rilevare la tossicità di contaminanti ambientali
 - Basato sulla luminescenza di un batterio marino (*Vibrio fischerii*)
 - Variazioni di luminosità (calo) sono direttamente correlate con la tossicità (relazioni dose-risposta)
 - Possibilità di calcolare LC50

TOSSICOGENOMICA: uno strumento sensibile e specifico

- La tossicogenomica e' un approccio rivoluzionario che consente di analizzare in un unico esperimento gli effetti indotti da una specifica esposizione sull'intero genoma
- Cio' e' stato reso possibile dal grande sforzo mondiale per completare il sequenziamento del genoma umano e dai grandi progressi fatti nel campo delle nanotecnologie
- Grazie a cio' l'intero genoma umano e' stato miniaturizzato su un unico vetrino



Perché l'approccio di tossicogenomica?

■ Tossicologia predittiva

□ Cosa è

- studio di come gli effetti tossici osservati in sistemi modello o nell'uomo possono essere usati per predire la patogenesi, fare stime di rischio e prevenire l'insorgenza di malattie nell'uomo

□ Cosa si prefigge

- Migliorare la stima di rischio

□ Il compito della tossicogenomica

- Migliora
- la comprensione delle correlazioni dose-risposta
- L'estrapolazione interspecie
- La quantificazione dell'esposizione
- La identificazione dei meccanismi di azione
- La valutazione delle suscettibilità individuali a un particolare composto

Tecnologie omiche

■ Genomica

- ❑ Per analizzare le sequenze del DNA e individuare polimorfismi

■ Trascrittomica

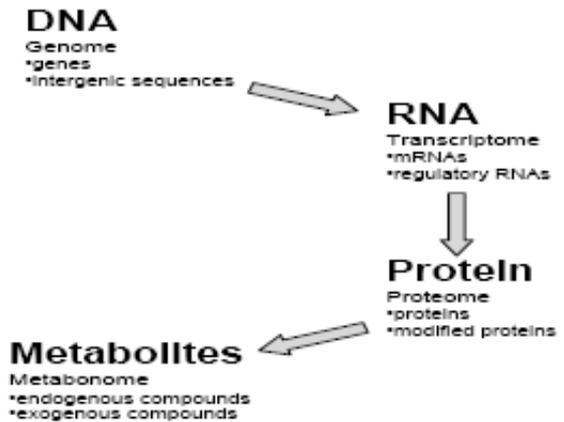
- ❑ Per analizzare i trascritti (RNA)

■ Proteomica

- ❑ Per analizzare le proteine

■ Metabonomica

- ❑ Per analizzare i metaboliti



Lab MATER @ ER-EPA

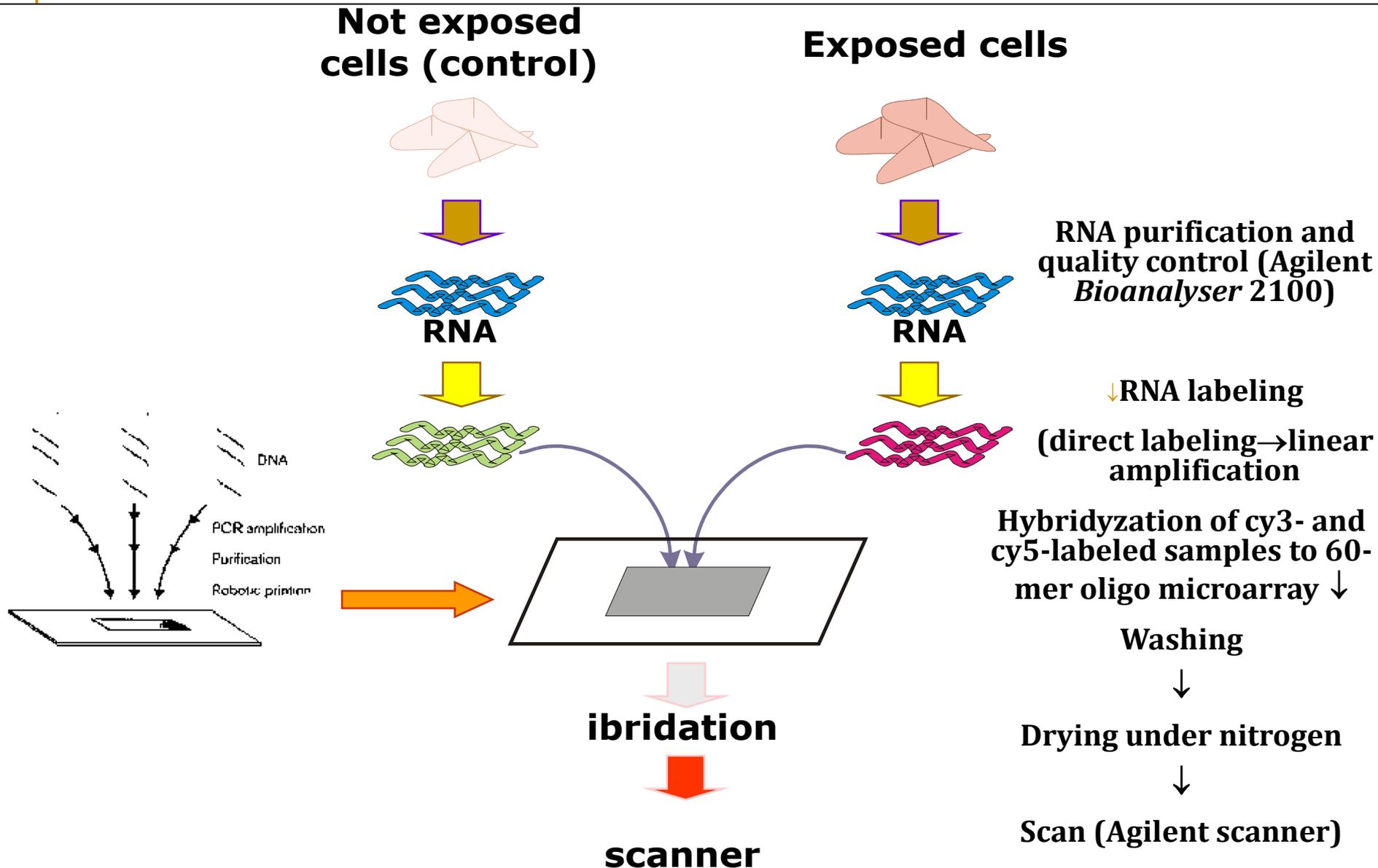


$O^3: 5\mu\text{g}/\text{m}^3$



| | |
|---------------------------------|-------------------|
| Number of genes and transcripts | ~41,000 |
| Feature size | 115 μm |
| Microarray format | 44K |
| Oligo probe length | 60-mer |

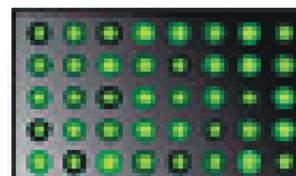
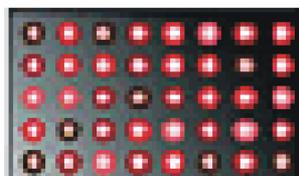
Dual-colour gene expression analysis





Scan 1

Scan 2



Combined image
in software

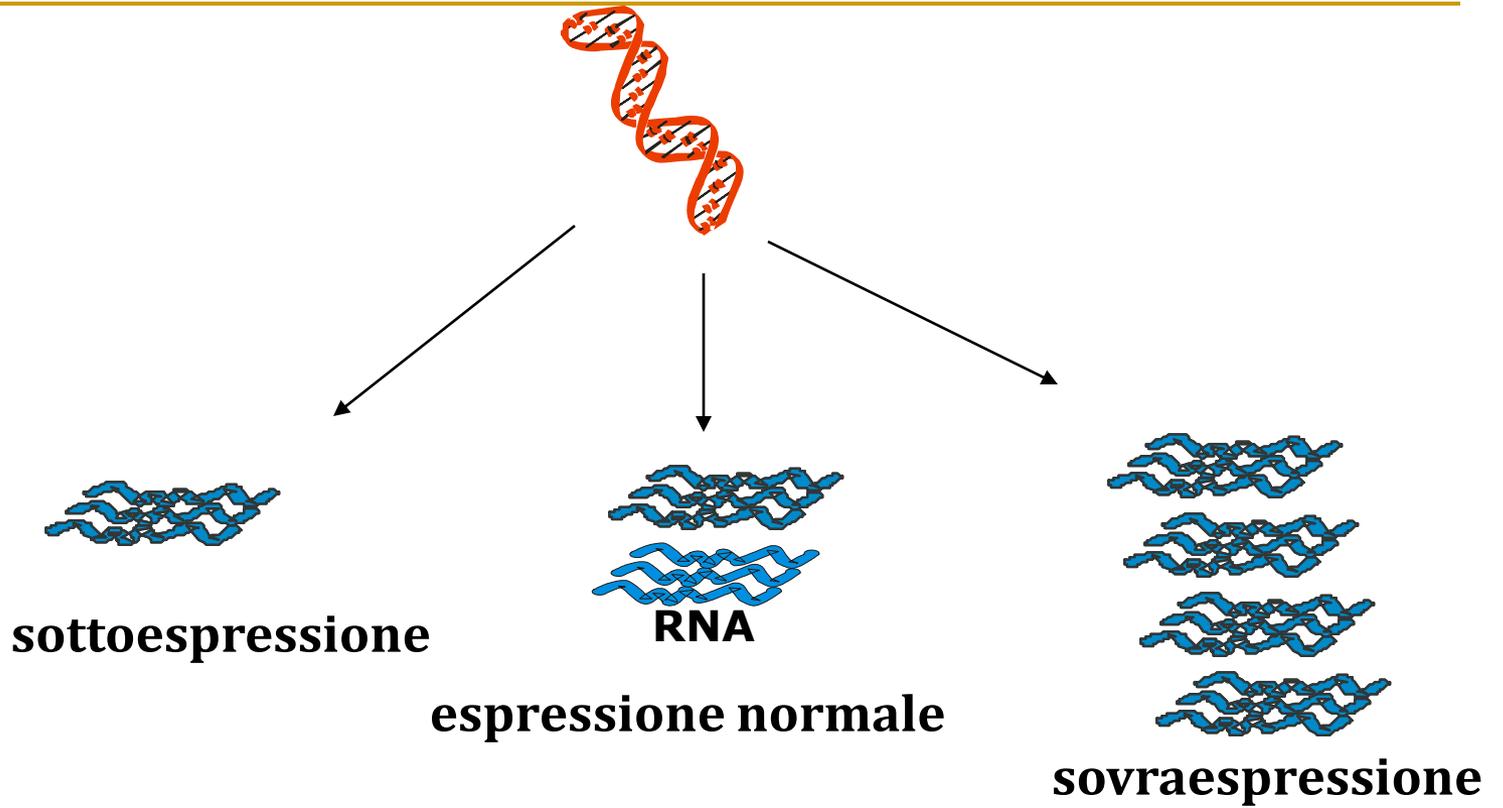


X

Y

Z

Bologna, 27 aprile 2010



Esposizione alimentare: lo studio MITICA



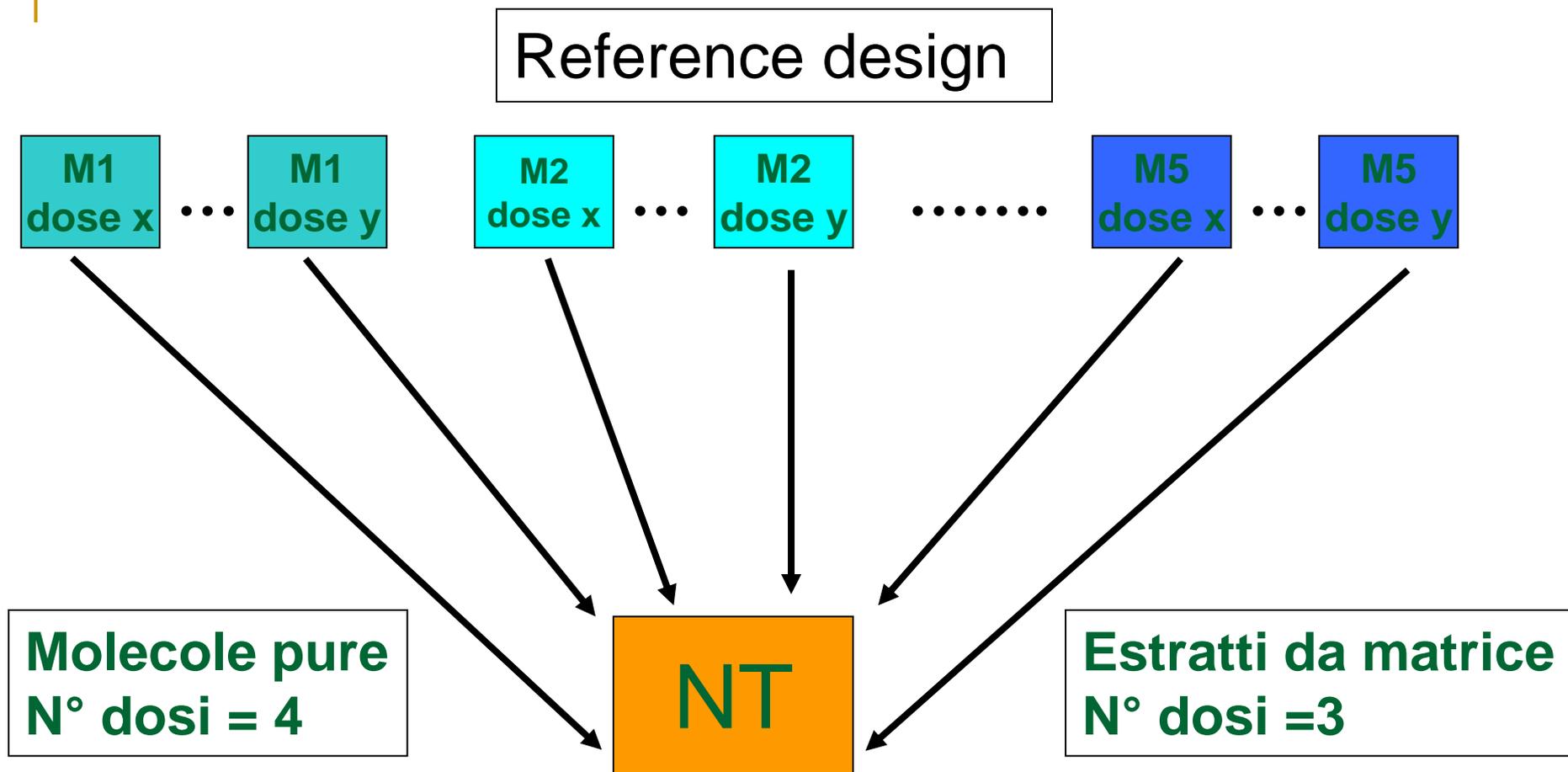
- Sviluppo di strumenti diagnostici innovativi per la rapida identificazione di classi di contaminanti in matrici alimentari

Il nostro progetto MITICA:

Molecole e matrici

| <u>Molecole</u> | | <u>LMR</u> | <u>Matrici</u> |
|---|---|--------------------------------|---------------------|
| penconazolo | → | 0.2 mg/Kg, uva | uva |
| PCB mix (miscela equimolare di 18 congeneri: 28, 52, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 177, 180, 183, 187) | → | 80 µg/Kg limite operativo | mangime completo |
| fumonisina B1 | → | 1400 µg/Kg, farine | farina di mais |
| zearalenone | → | > 500µ | |
| | → | 75 µg/Kg, farine di cereali | farina di mais |
| aflatossina M1 | → | 0.05 µg/Kg, latte | latte |

Microarray: disegno sperimentale



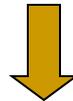
1° step: individuare il pattern di geni associato all'esposizione a una certa molecola

II° step: testare il pattern di geni con campioni di cui conosco la

Penconazol data-set analysis

Gene Spring GX

- Base-line to median of all samples
- Dose interpretation
- 1 way Anova, $p < 0.05$; Benjamini-Hochberg correction



1874 modulated gene
(preliminary results)

**OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT, 29-Apr-2005.
Number 50, REPORT OF THE OECD/IPCS WORKSHOP ON
TOXICOGENOMICS, Kyoto, 13-15 October 2004**

The term 'ecotoxicogenomics' describes the integration of genomics into ecotoxicology.

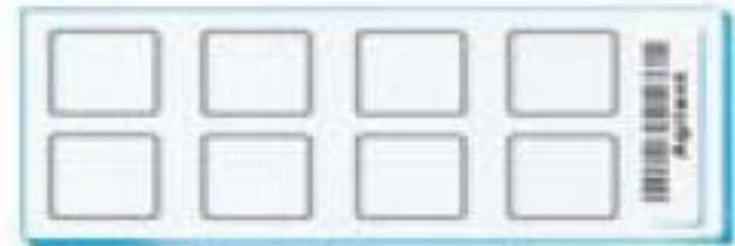
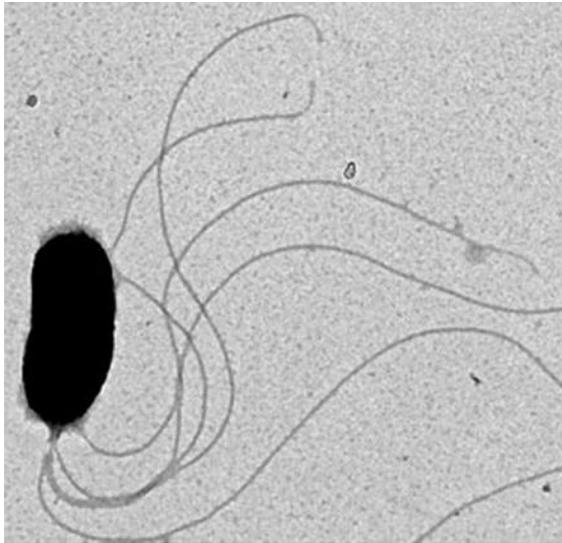
The Population and Molecular Stress Responses of
Daphnia magna

- Slide for studying the gene profile (3000 genes)
- Response to cadmium



Environ Sci Technol. 2008 Mar, Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium.

Il genoma di *V. fisherii*



8 x 15K slide

3 replicates of the entire genome

3747 60 mer-probes

371 probes from *V. cholerae*
(specificity control)

The use of a *Vibrio fischeri* slide to discriminate toxicological profiles

11.2 mg/l FB1+5.6 FB2 (3:1)
16 mg/l, FB1
16 mg/l, FB2

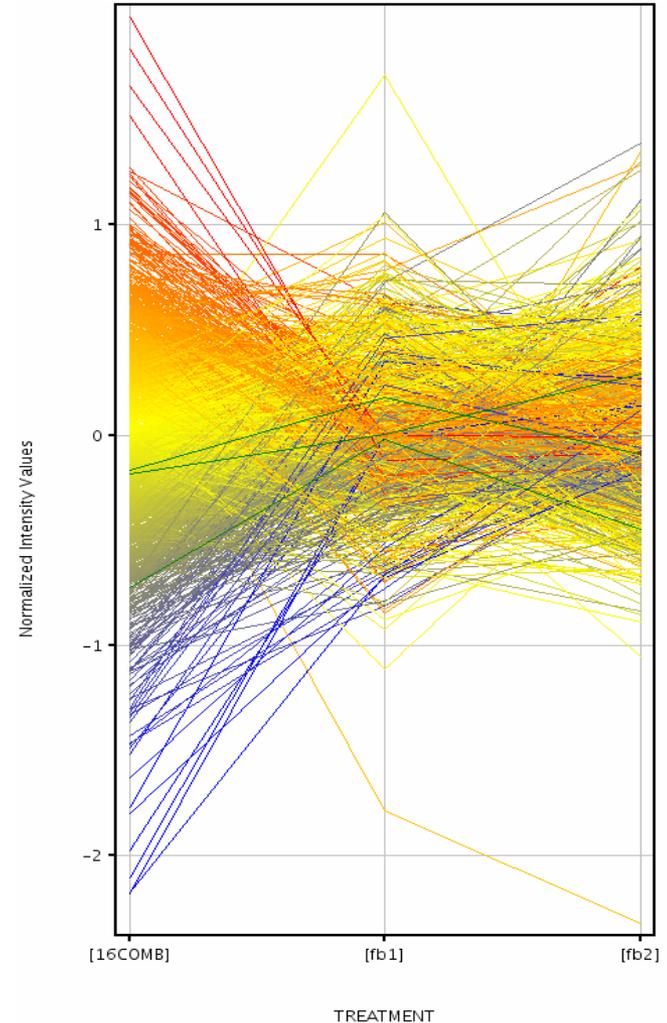
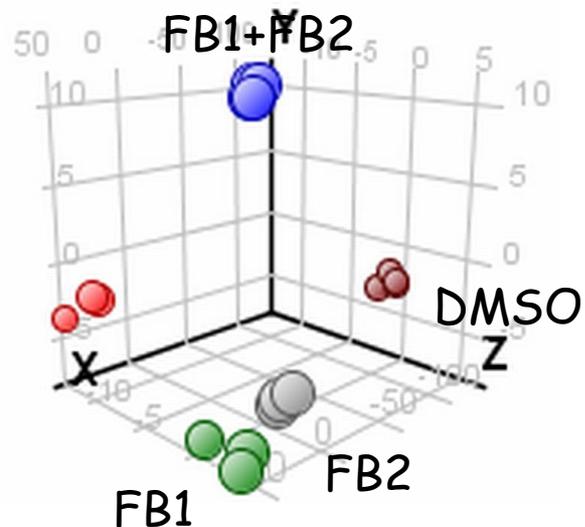
} in triplicates

Gene Spring GX:

1-way ANOVA

FDR $p < 0.05$

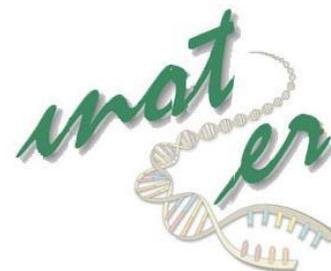
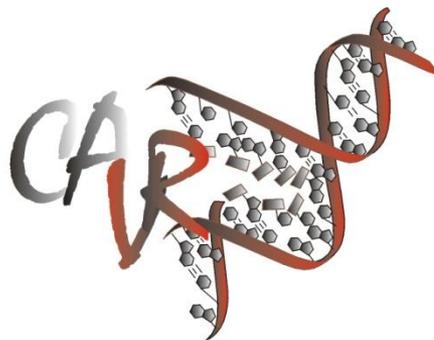
PCA



LABORATORIO



MECCANISMI
CANCEROGENESI E
ANTICANCEROGENESI



MicroArray
Technology
Emilia Romagna

@

<http://www.arpa.emr.it/cancerogenesi/>