

*Aspetti etici e Regolamento REACH:
la promozione dei metodi alternativi
"in vitro" ed "in silico" per limitare le
sperimentazioni sugli animali*

Dott. Iacopo Carlini

Pisa, 23/01/2016

REACH: innanzitutto, di cosa parliamo?

- Il Regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH) è il nuovo regolamento europeo nato per valutare e gestire i rischi per la salute umana e per l'ambiente delle sostanze chimiche in commercio;
- REACH è un sistema integrato di registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche che mira ad assicurare un maggiore livello di protezione della salute umana e dell'ambiente;
- Costituisce la più importante sfida normativa per misurare la sicurezza chimica che sia mai stata concepita al mondo e definita in varie pubblicazioni come «*the world's most demanding chemicals regime so far*»;
- All'origine del Regolamento c'era la crescente consapevolezza che nel mercato dell'Unione Europea circolano decine di migliaia di sostanze chimiche delle cui proprietà tossicologiche ed ecotossicologiche si sa poco o nulla e della necessità di colmare questa lacuna informativa («data gap»).

Aspetti etici e REACH: come si coniugano?

Articolo 1

Finalità e portata

1. Il presente regolamento ha lo scopo di assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente inclusa la promozione di metodi alternativi per la valutazione dei pericoli che le sostanze comportano, nonché la libera circolazione di sostanze nel mercato interno rafforzando nel contempo la competitività e l'innovazione.

Aspetti etici e REACH: come si coniugano?

- Principio delle 3R:
 - *Refine*: procedimenti meno dolorosi;
 - *Reduce*: utilizzo di un minor numero di animali;
 - *Replace*: sostituzione completa degli animali.

introdotto da Rex Burch e William Russell nel 1959 relativamente alla sperimentazione animale: concetto di base da cui nasce l'esigenza di promozione dei metodi alternativi sotto REACH;

- Principio delle 3R recepito dalla Direttiva Europea (86/609/CEE) e riconfermato nella Direttiva Europea (2010/63/UE).

Aspetti etici e REACH: come si coniugano?

- REACH cerca il giusto «equilibrio» tra migliore comprensione della pericolosità delle sostanze chimiche e obiettivo di evitare sperimentazioni inutili sugli animali.
- Sotto REACH sono previste due modalità per mantenere al minimo il numero di sperimentazioni necessarie sugli animali:
 - *Condivisione dei dati*
 - *Uso di metodi e approcci alternativi*
- La sperimentazione sugli animali (ai fini di una migliore conoscenza delle sostanze chimiche) è considerata l'ultima risorsa.

Strategie per evitare sperimentazioni inutili sugli animali

- Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)
- Raggruppamento di sostanze e metodo del read-across
- Metodi *in vitro*

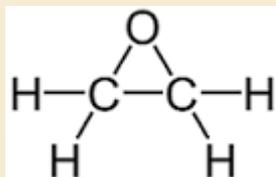
***Non-Testing
method
«in silico»***

Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)

Definizione

- **SAR** (Relazione struttura-attività) è una relazione qualitativa che collega una (sotto)struttura alla presenza o assenza di una proprietà o attività d'interesse.

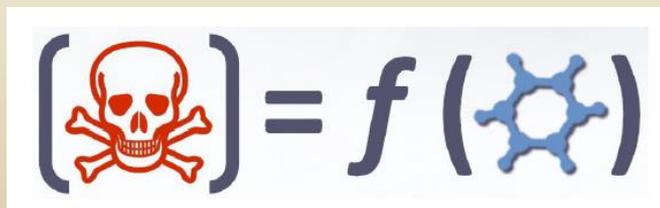
Es.



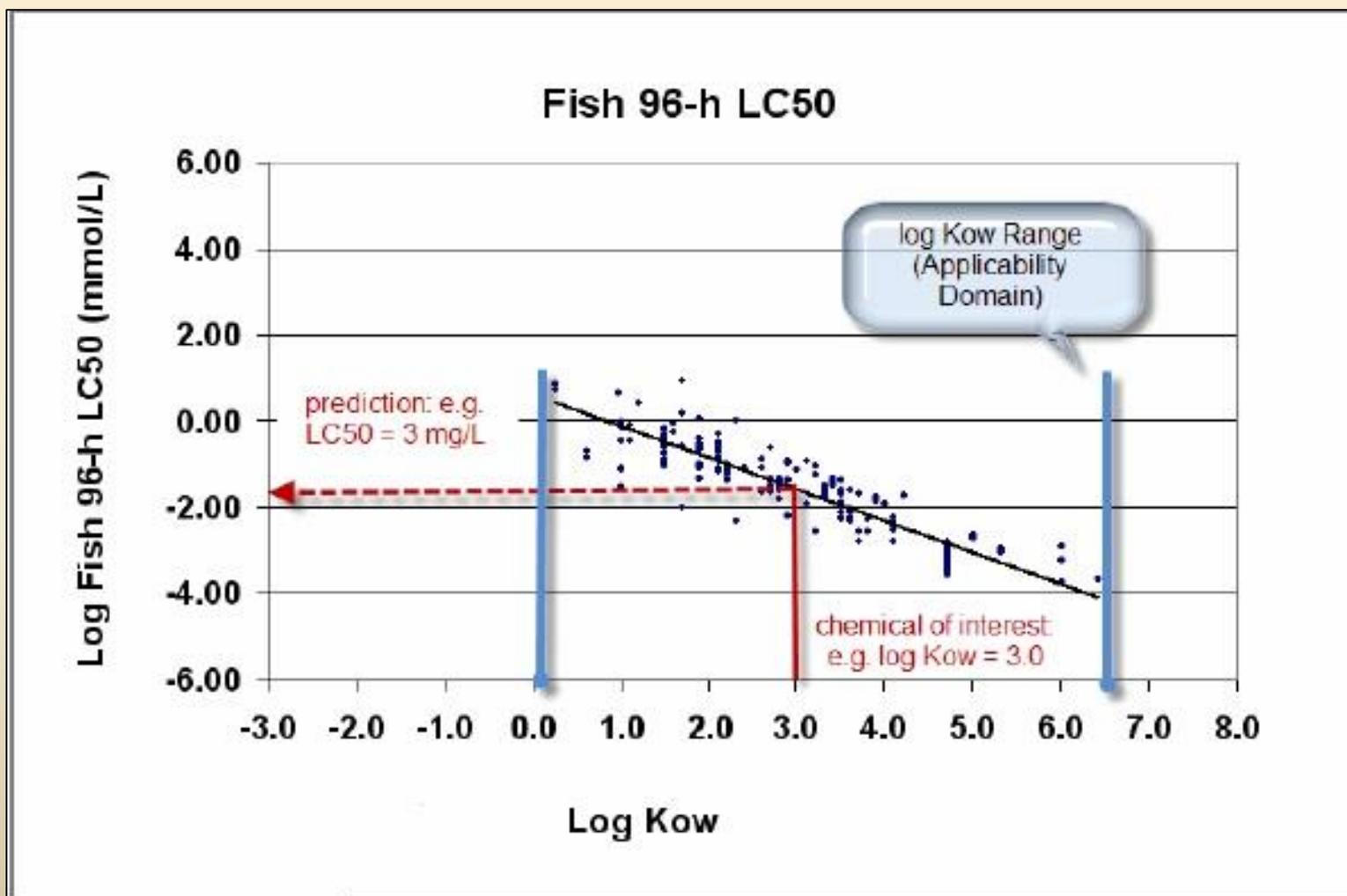
Presenta un alert strutturale per la cancerogenicità

- **QSAR** (Relazione quantitativa struttura-attività) è un modello matematico che collega i parametri quantitativi derivati da strutture chimiche ad una misura quantitativa di una proprietà o di un'attività.

formula matematica generale: Attività = f (proprietà chimico-fisiche e/o strutturali)



Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)



Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)

- L'approccio può essere usato per prevedere proprietà chimico-fisiche, (eco)tossicologiche e sul destino nell'ambiente in maniera qualitativa o quantitativa a seconda del tipo di struttura chimica.
- I risultati possono essere usati invece dei dati sperimentali a condizione che siano soddisfatte le seguenti condizioni (da All. XI di REACH):
 1. i risultati sono derivati da un modello (Q)SAR di cui è stata stabilita la **validità scientifica**,
 2. la sostanza rientra nel **campo di applicabilità** del modello (Q)SAR,
 3. i risultati sono **idonei** ai fini della classificazione e dell'etichettatura e/o della valutazione dei rischi, e
 4. è fornita una **documentazione** adeguata e attendibile del metodo applicato.
- In altri casi, i modelli possono essere usati per fornire informazioni aggiuntive ai dati sperimentali

Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)

1. Validità scientifica

5 Principi OCSE per la validità di un modello QSAR:

1. Ha un endpoint definito.
2. È descritto con un algoritmo non ambiguo.
3. Ha un campo di applicabilità definito.
4. È descritto con sufficienti caratteristiche statistiche.
5. Offre un'interpretazione meccanicistica, se possibile.

(principi adottati a seguito del 37th Joint Meeting of Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, Pesticides & Biotechnology; 17-19Nov2004)

Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)

2. Campo di applicabilità

- Il dominio di applicabilità di un modello si riferisce al tipo di risposta ed allo spazio delle strutture chimiche per cui il modello è in grado di fare le previsioni con una data di affidabilità;
- Idealmente, lo spazio delle strutture chimiche dovrebbe essere descritto sia da elementi strutturali, sia da elementi chimico-fisici
- La risposta potrebbe essere qualsiasi proprietà chimico-fisica, tossicologica, o effetto ambientale

Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)

2. Campo di applicabilità

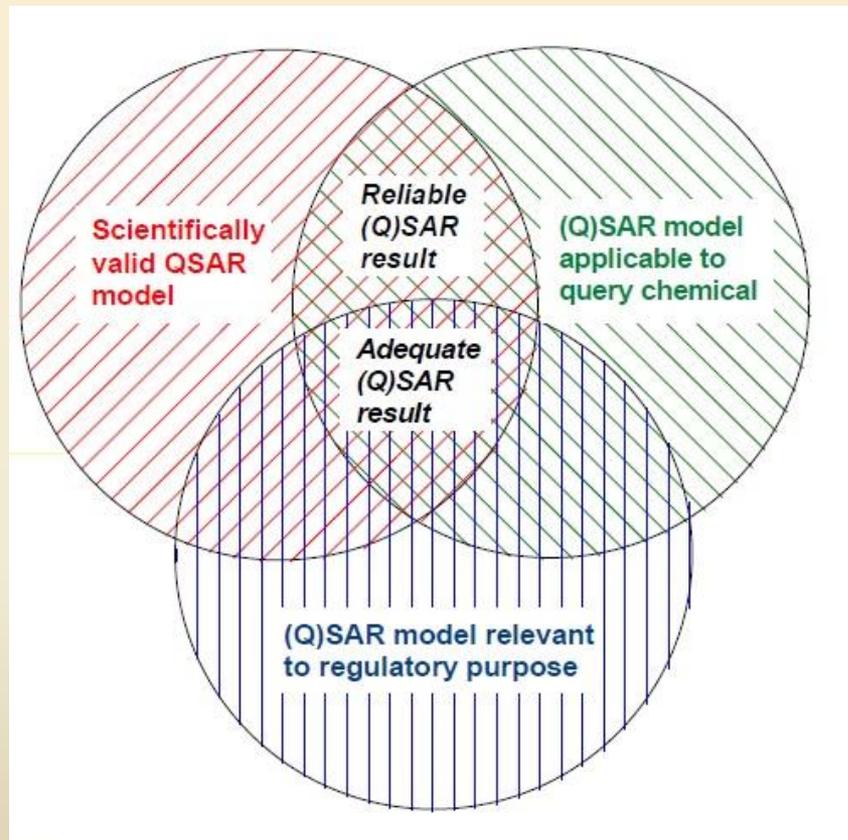
Da prendere in considerazione:

- Campo chimico
 - strutturale (gruppi funzionali e loro distribuzione)
 - chimico-fisico (gamma e copertura)
- Campo biologico/tossicologico (campo meccanicistico)
 - stesso modo di azione
 - stessa gamma di attività
- Campo metabolico
 - trasformazione o metabolismo

Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)

3. Risultati idonei ai fini della classificazione e dell'etichettatura e/o della valutazione dei rischi:

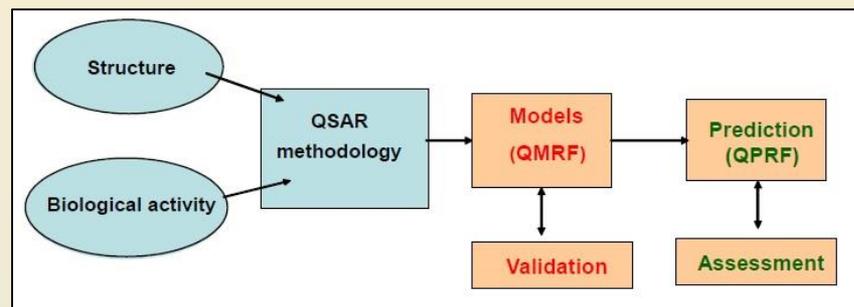
- L' **adeguatezza** di un (Q)SAR è correlata alla **validità scientifica e applicabilità** del modello ad una certa sostanza chimica, nonché alla pertinenza del modello per lo scopo del regolamento.
- Validità scientifica e applicabilità insieme determinano l'**attendibilità** di un modello (Q)SAR.



Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)

4. E' fornita una documentazione adeguata e attendibile del metodo applicato.

- Il formato di comunicazione del modello (Q)SAR (QMRF) è un sommario esauriente di un modello (Q)SAR, che riporta le informazioni chiave sul modello in conformità dei principi di validazione dell'OCSE;
- Il formato di comunicazione delle previsioni (Q)SAR (QPRF) è una descrizione e una valutazione della previsione fatta con un dato modello per una determinata sostanza chimica;



Modelli di relazioni quantitative struttura-attività (QSAR)

- I risultati di (Q)SAR possono essere utilizzati in luogo della sperimentazione quando sono ottemperate le condizioni da All. XI punto 1.3 di REACH;
- I risultati di (Q)SAR possono essere usati anche nell'approccio ITS (Integrated Testing Strategy);
- Nei casi in cui vi sia incertezza in relazione a uno o più elementi informativi, i risultati (Q)SAR possono comunque essere utilizzati nel contesto dell'approccio basato sul **peso dell'evidenza**;

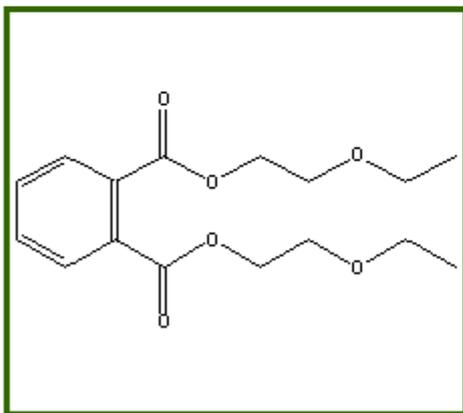
Raggruppamento di sostanze e metodo del read-across

- Le sostanze le cui proprietà fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche sono presumibilmente simili o seguono uno schema regolare data la loro affinità strutturale possono essere considerate come un «gruppo» o una «categoria» di sostanze.
- Le affinità possono essere basate sui seguenti elementi:
 - 1) un gruppo funzionale comune;
 - 2) i precursori comuni e/o la probabilità di prodotti di decomposizione comuni derivanti da processi fisici e biologici, che danno luogo a sostanze chimiche strutturalmente affini; o
 - 3) uno schema costante nella variazione della potenza delle proprietà nell'intera categoria.
- In tutti i casi i risultati devono:
 - essere idonei ai fini della classificazione e dell'etichettatura e/o della valutazione dei rischi;
 - fornire un'adeguata e attendibile copertura dei parametri chiave presi in considerazione nel metodo di prova corrispondente (da articolo 13, paragrafo 3 di REACH);
 - contemplare una durata di esposizione comparabile o superiore a quella del metodo di prova corrispondente (da articolo 13, paragrafo 3 di REACH), se tale durata di esposizione costituisce un parametro pertinente, e
 - essere corredati di una documentazione adeguata e attendibile del metodo applicato.

Raggruppamento di sostanze e metodo del read-across

	Source chemical	Target chemical
Property		

1,2-Benzenedicarboxylic acid,
bis(2-ethoxyethyl) ester

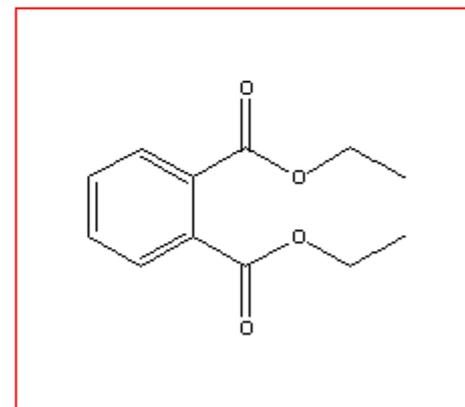


Known to be harmful: $1 < \log LC50 < 2$

Acute fish toxicity?



diethyl phthalate



Predicted to be harmful

Raggruppamento di sostanze e metodo del read-across

- Il Read-across può essere fatto per colmare le lacune di dati per:
1) sostanze appartenenti ad un «gruppo» (approccio per «analoghi», basato su un numero relativamente ridotto di sostanze)
e
2) sostanze appartenenti ad una «categoria»
- Un «gruppo» è un numero di sostanze per le quali, in virtù della loro similarità, si prevede che abbiano proprietà rilevanti sotto REACH (non necessariamente per tutte le proprietà rilevanti sotto REACH);
- Una «categoria» è un «gruppo» esteso che mostra un certo uno schema regolare (trend) quando un descrittore chimico (es. peso molecolare) o una proprietà chimico-fisica (es. coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua) è riportato graficamente rispetto ad una proprietà rilevante sotto REACH (es. tossicità a dose ripetuta nei ratti). Nel caso di una categoria, uno schema regolare («trend») fornisce un potere predittivo superiore. Così, un read-across per un certo endpoint è più robusto scientificamente se all'interno di una categoria.

Raggruppamento di sostanze e metodo del read-across

- All'interno di un gruppo di sostanze chimiche, il read-across può essere eseguito nei seguenti modi per colmare le lacune di dati:
 - «*One-to-one*» (un analogo utilizzato per fare una stima per una singola sostanza chimica);
 - «*Many-to-one*» (due o più analoghi usati per fare una stima per una singola sostanza chimica);
 - «*One-to-Many*» (un analogo utilizzato per fare stime per due o più sostanze chimiche);
 - «*Many-to-many*» (due o più analoghi utilizzati per fare delle stime per due o più sostanze chimiche).

Raggruppamento di sostanze e metodo del read-across

one-to-one

	Substance 1	Substance 2
Property		



 reliable data point
 missing data point

many-to-one

	Substance 1	Substance 2	Substance 3
Property			



Raggruppamento di sostanze e metodo del read-across

	Chemical 1	Chemical 2	Chemical 3	Chemical 4
Property 1	●	○	●	○
Property 2	●	○	●	●
Property 3	○	●	●	○
Property 4	●	●	●	●
Activity 1	○	○	○	○
Activity 2	●	●	●	●
Activity 3	○	○	○	○
Activity 4	○	○	○	○

read-across

Trend analysis

● reliable data point

○ missing data point

OECD QSAR Toolbox

Un'agenzia dell'Unione europea Documentazione Notizie ed eventi Stampa Contatti italiano (it)

ECHA
EUROPEAN CHEMICALS AGENCY

Ricerca la pagina web dell'ECHA Ricerca avanzata >

L'Agenzia Regolamenti Trattamento delle sostanze chimiche problematiche Informazioni sulle sostanze chimiche Le sostanze chimiche nella vostra vita Assistenza

ECHA > Assistenza > QSAR Toolbox

G f t e + 0

+ L'Agenzia
+ Regolamenti
+ Trattamento delle sostanze chimiche problematiche
+ Informazioni sulle sostanze chimiche
+ Le sostanze chimiche nella vostra vita
- Assistenza
+ Guida
+ Introduzione
> Domande e risposte
> Metodi di sperimentazione e alternative
+ Webinar

QSAR Toolbox



Il Toolbox è un'applicazione software progettata per essere usata da governi, industria chimica e altre parti interessate a colmare lacune nei dati di (eco)tossicità necessari a valutare i pericoli delle sostanze chimiche. Il Toolbox incorpora informazioni e strumenti provenienti da varie fonti in un flusso di lavoro logico. Di cruciale importanza per questo flusso di lavoro è il raggruppamento di sostanze chimiche in categorie chimiche.

Le caratteristiche determinanti del Toolbox sono:

1. identificazione di caratteristiche strutturali rilevanti e meccanismi o modalità di azione potenziali di una sostanza chimica bersaglio;
2. identificazione di altre sostanze chimiche che hanno le stesse caratteristiche strutturali e/o meccanismi o modalità d'azione;
3. uso di dati sperimentali esistenti per colmare lacune nei dati.

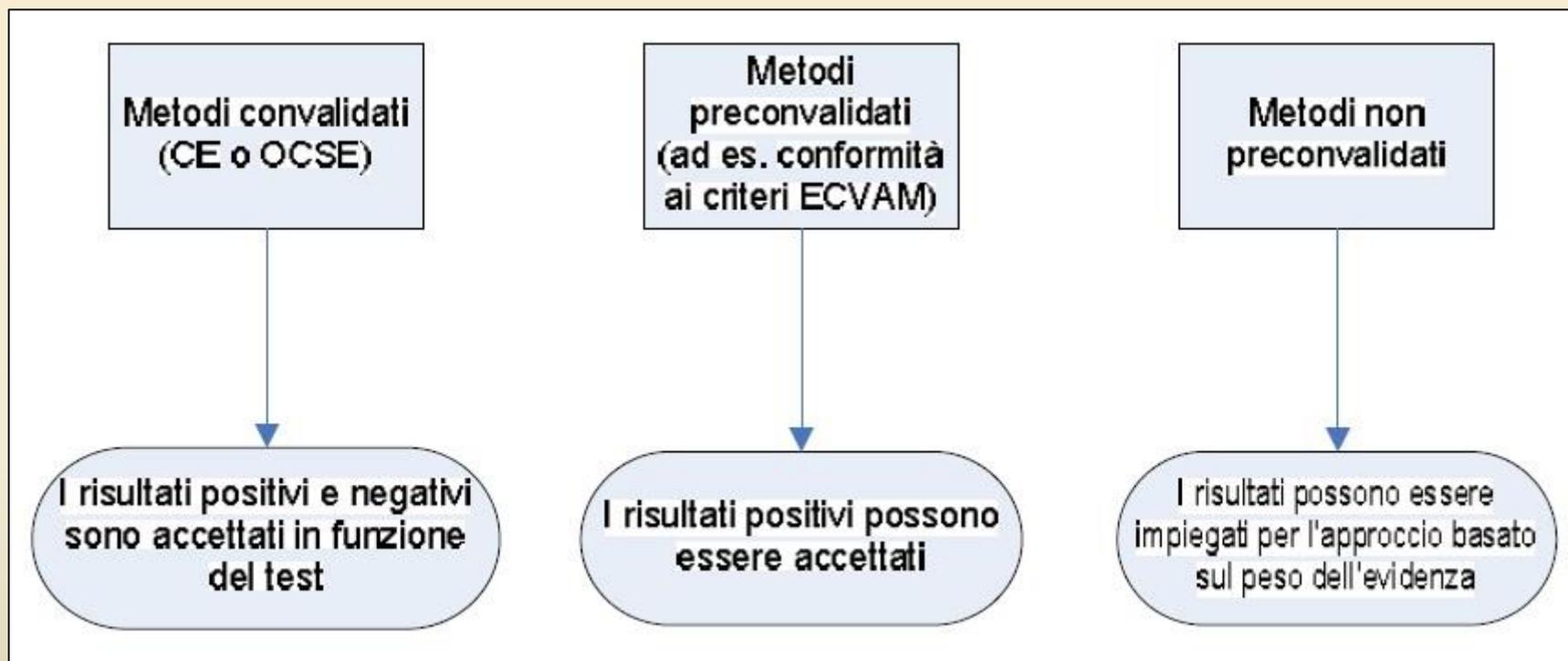
Related links

- > [QSAR Toolbox website](#)
- > [Download the latest version](#)
- > [Grouping of Chemicals: Chemical Categories and Read-Across](#)

Metodi *in vitro*

- Una prova eseguita *in vitro* si svolge in un ambiente controllato, quale una provetta o una piastra di Petri, e non fa uso di un organismo vivente. Una prova eseguita *in vivo* è un saggio che utilizza un organismo vivente, ad esempio un animale vertebrato;
- I risultati ottenuti mediante metodi *in vitro* idonei, possono indicare la presenza di determinate proprietà pericolose o possono essere rilevanti per la comprensione della modalità d'azione di una sostanza;
- Due aspetti da considerare per l'uso di metodi *in vitro* ai sensi di REACH :
 1. *Idoneità della metodologia*
 2. *Adeguatezza dei dati ottenuti con questo metodo*
- Due categorie di metodi *in vitro* nell'ambito di REACH considerati idonei
 1. Metodi convalidati a livello internazionale (es. regolamento CE sui metodi di prova o linee guida OCSE) es. prove *in vitro* per irritazione/corrosione cutanea e test di genotossicità *in vitro*, ad es. test di Ames sulla mutagenicità
 2. Metodi preconvalidati: test *In vitro* che soddisfano criteri di prevalidazione riconosciuti a livello internazionale (es. criteri ECVAM per l'immissione nel processo di prevalidazione)

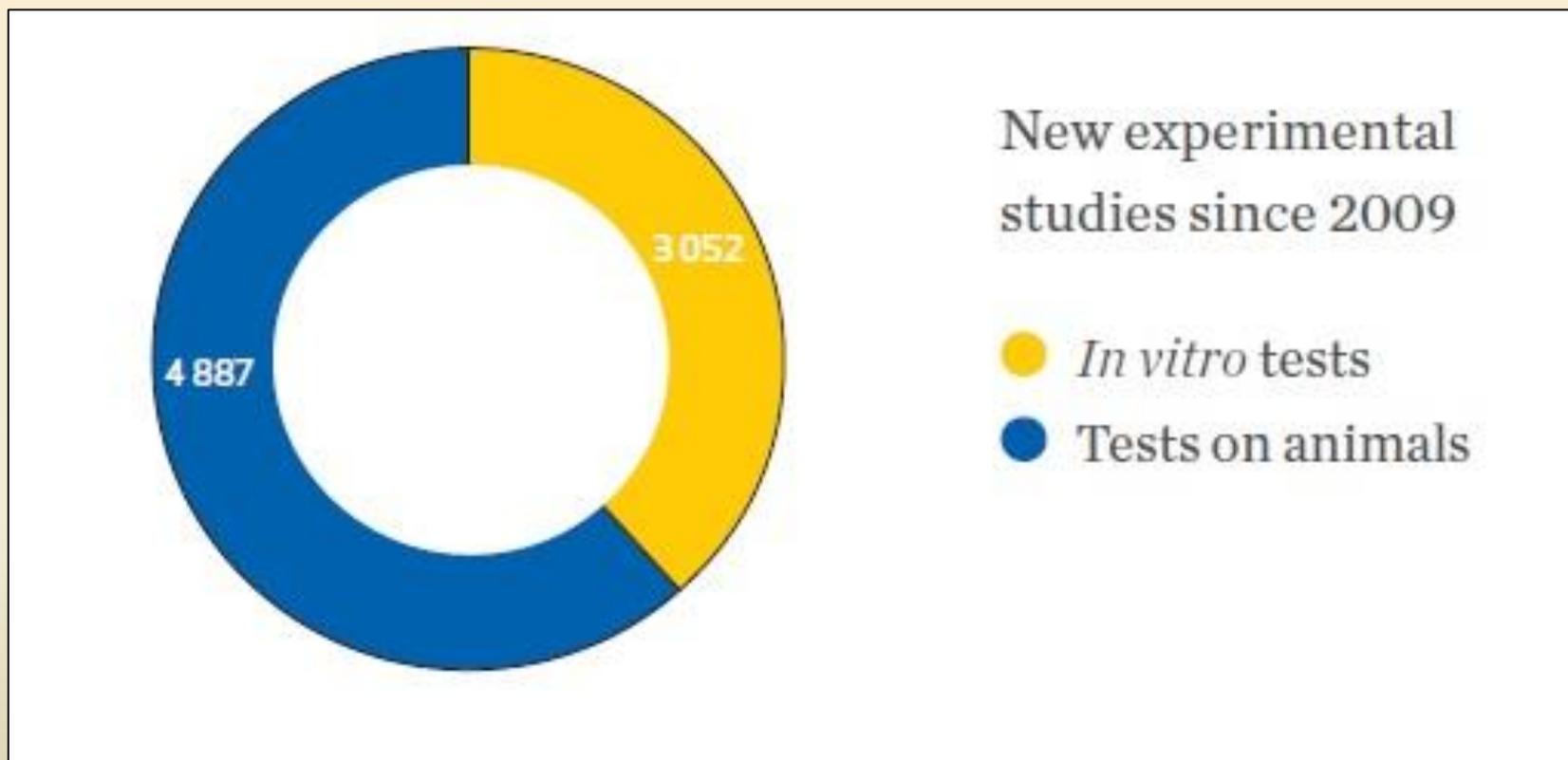
Metodi *in vitro*: le categorie



Esempi di metodi *in vitro* convalidati a livello internazionale

- Metodi *in vitro* per l'endpoint di corrosione dermica:
 - The transcutaneous electrical resistance (TER, rat skin) test (OECD TG 430)
 - Human skin model (HSM) tests (OECD TG 431)
 - The *in vitro* membrane barrier test method (OECD TG 435)
- Metodi *in vitro* per l'endpoint di irritazione dermica:
 - EpiSkinTM, the modified EpiDermTM and the SkinEthicTM RHE test method (OECD TG 439)
- Metodi *in vitro* per l'endpoint dei gravi danni oculari:
 - The Isolated Chicken Eye (ICE) test (OECD TG 438; TM B.48 da Regolamento CE n. 440/2008),
 - The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test (OECD TG 437; TM B.47 da Regolamento CE n. 440/2008)
 - The Fluorescein Leakage (FL) test (OECD TG 460).

Metodi *in vitro*: la crescita



Conclusioni

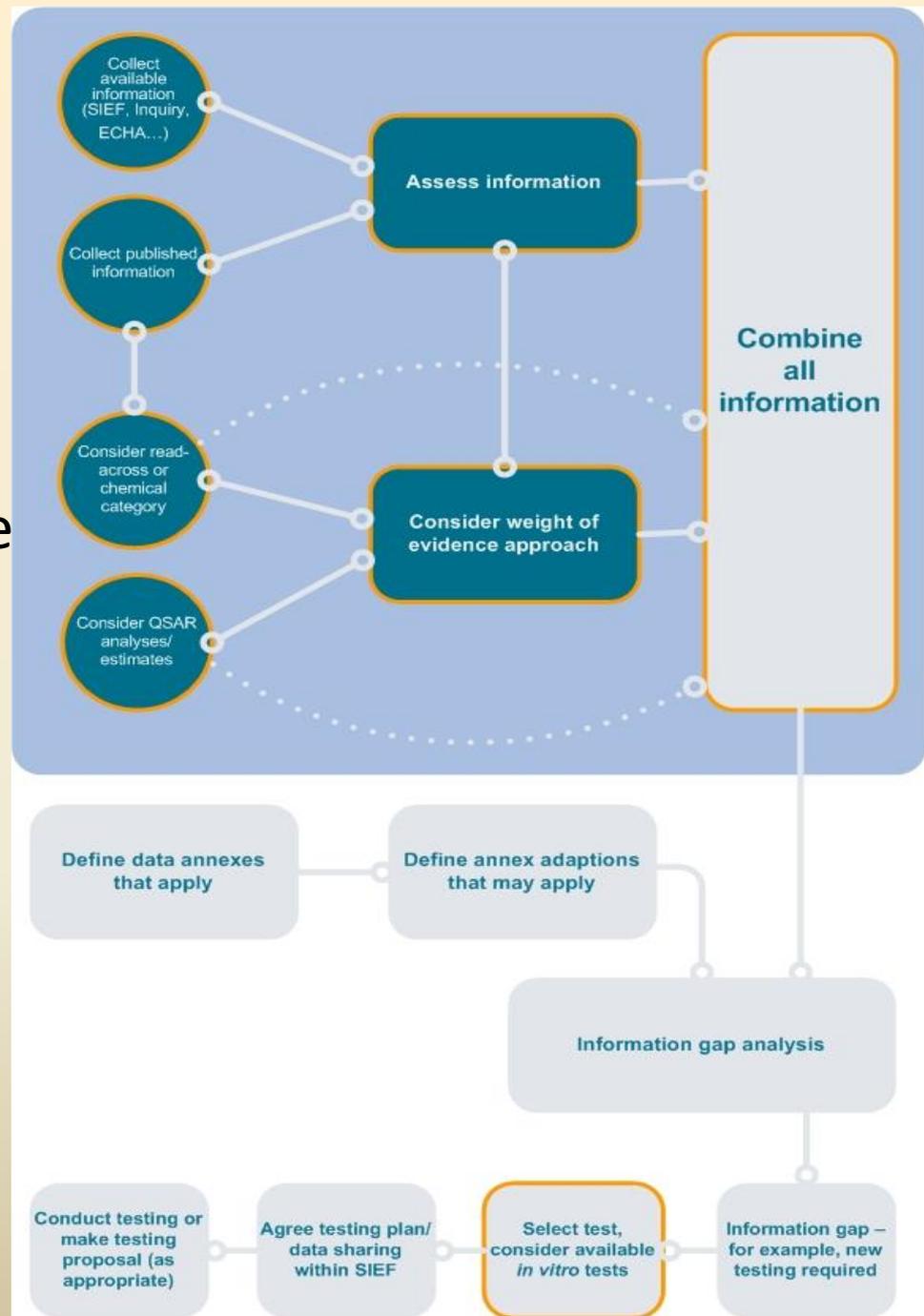
- REACH propone come uno dei suoi elementi cardine la promozione dei metodi alternativi per limitare la sperimentazione animale;
- Negli ultimi anni sono stati validati da ECVAM nuovi metodi *in vitro* e si è reso più frequente l'uso dei metodi *in silico* per l'hazard ed il risk assessment delle sostanze;
- A seguito dell'entrata in vigore di REACH, gradualmente sia l'industria europea, sia le Autorità hanno iniziato a dare un «peso» sempre maggiore ai risultati ottenuti mediante metodi alternativi per l'hazard ed il risk assessment delle sostanze
- La strada da percorrere è ancora molto lunga, ma i segnali iniziano finalmente ad essere incoraggianti: es. è notizia di fine 2015 che il prossimo emendamento del testo di REACH eliminerà in toto l'obbligo di test in vivo per determinare gli effetti di corrosione/irritazione dermica e di gravi danni/irritazione oculare;

Grazie per l'attenzione

ADDENDUM

Il processo di raccolta delle informazioni

- FASE 1 — Raccolta e condivisione delle informazioni esistenti
- FASE 2 — Determinazione delle informazioni necessarie
- FASE 3 — Identificazione delle informazioni mancanti
- FASE 4 - Produzione di nuovi dati o proposta di una strategia di sperimentazione



Metodi *in vitro*: le condizioni per l'utilizzo

1. I dati ricavati da metodi di prova *in vitro* (convalidati e prevalidati) possono essere utilizzati ai sensi del REACH a condizione che le informazioni relative agli end point di pericolo siano esaustive ai fini della classificazione ed etichettatura e/o della valutazione dei rischi.
2. Quando si utilizza un metodo prevalidato, il dichiarante deve valutare che il metodo in questione sia conforme ai criteri di prevalidazione dell'ECVAM e deve giustificarne l'adeguatezza all'uso nel fascicolo di registrazione.
3. Metodi *in vitro* all'avanguardia possono fornire informazioni preziose sulla modalità di azione delle sostanze e possono fare parte di una giustificazione per il read-cross o la categoria.
4. Dati *in vitro* prodotti utilizzando altri metodi (ad esempio metodi non prevalidati) possono essere utilizzati unicamente come informazioni di supporto (vale a dire come parte di una giustificazione del peso dell'evidenza).
5. Nel fascicolo di registrazione deve essere comunque sempre fornita una descrizione chiara e dettagliata dei risultati, le condizioni di prova e l'interpretazione dell'utilità dei risultati. Ciò è necessario se lo studio è utilizzato come studio chiave o come parte di un approccio basato sul peso dell'evidenza.
6. Le limitazioni del metodo devono essere chiaramente comunicate; per esempio i metodi di prova *in vitro* non consentono di replicare tutti i processi metabolici pertinenti alla tossicità chimica che si verificano *in vivo*.
7. In tutti i casi devono essere soddisfatte le condizioni stabilite nell'allegato XI al regolamento REACH, sezione 1.4.

ALLEGATO XI

NORME GENERALI PER L'ADATTAMENTO DEL REGIME DI SPERIMENTAZIONE STANDARD DI CUI AGLI ALLEGATI DA VII A X

.....

1.3. Relazione qualitativa o quantitativa struttura-attività [(Q)SAR]

I risultati ottenuti per mezzo di validi modelli di relazione qualitativa o quantitativa struttura-attività (Q)SAR possono indicare la presenza o l'assenza di una certa proprietà pericolosa. I risultati possono essere utilizzati in luogo della sperimentazione quando sono soddisfatte le seguenti condizioni:

- i risultati sono derivati da un modello (Q)SAR di cui è stata stabilita la validità scientifica,
- la sostanza rientra nel campo di applicabilità del modello (Q)SAR,
- i risultati sono idonei ai fini della classificazione e dell'etichettatura e/o della valutazione dei rischi, e
- è fornita una documentazione adeguata e attendibile del metodo applicato.

In collaborazione con la Commissione, gli Stati membri e le parti interessate, l'Agenzia elabora e fornisce orientamenti valutando quali (Q)SAR risponderanno a queste condizioni e presenta esempi.

1.4. Metodi in vitro

I risultati ottenuti con idonei metodi in vitro possono indicare la presenza di una certa proprietà pericolosa, o possono essere importanti in relazione a una comprensione meccanicistica, che può essere rilevante per la valutazione. In questo contesto, «idonei» significa elaborati sufficientemente bene secondo criteri per lo sviluppo di test riconosciuti a livello internazionale [ad esempio: i criteri del Centro europeo per la convalida dei metodi alternativi (ECVAM) per l'immissione di una prova nel processo di prevalidazione]. In funzione del rischio potenziale, può essere necessaria una conferma immediata, che richiede sperimentazioni al di là di quanto previsto negli allegati VII o VIII, o una proposta di conferma, che richiede sperimentazioni al di là di quanto previsto negli allegati IX o X per i rispettivi livelli di tonnellaggio.

Se i risultati ottenuti utilizzando tali metodi in vitro non rivelano una certa proprietà pericolosa, la prova pertinente è tuttavia effettuata al livello di tonnellaggio appropriato per confermare il risultato negativo, tranne se la sperimentazione non è prescritta a norma degli allegati da VII a X o delle altre disposizioni del presente allegato.

Tale conferma può essere omessa se sono soddisfatte le seguenti condizioni:

- 1) i risultati sono derivati da un metodo in vitro la cui validità scientifica è stata stabilita da uno studio di validazione, secondo principi di validazione riconosciuti a livello internazionale;
- 2) i risultati sono idonei ai fini della classificazione e dell'etichettatura e/o della valutazione dei rischi; e
- 3) è fornita una documentazione adeguata e attendibile del metodo applicato.

1.5. Raggruppamento di sostanze e metodo del read-across

Le sostanze le cui proprietà fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche sono probabilmente simili o seguono uno schema regolare data la loro affinità strutturale possono essere considerate come un gruppo o una «categoria» di sostanze. Per l'applicazione del concetto di gruppo occorre che le proprietà fisico-chimiche, gli effetti sulla salute umana e sull'ambiente o il destino ambientale possano essere previsti sulla base di dati relativi a sostanze di riferimento appartenenti al gruppo, estesi mediante interpolazione ad altre sostanze dello stesso gruppo (metodo del read-across). Ciò permette di evitare di sottoporre a prova ogni sostanza per ogni «*end point*». L'Agenzia, previa consultazione dei portatori di interessi e delle altre parti interessate, emana orientamenti sulla metodologia tecnicamente e scientificamente giustificata per il raggruppamento delle sostanze, con sufficiente anticipo rispetto alla prima scadenza di registrazione per le sostanze soggette a un regime transitorio.

Le affinità possono essere basate sui seguenti elementi:

- 1) un gruppo funzionale comune;
- 2) i precursori comuni e/o la probabilità di prodotti di decomposizione comuni derivanti da processi fisici e biologici, che danno luogo a sostanze chimiche strutturalmente affini; o
- 3) uno schema costante nella variazione della potenza delle proprietà nell'intera categoria.

Se è applicato il concetto di gruppo, le sostanze sono classificate ed etichettate su questa base.

In tutti i casi i risultati devono:

- essere idonei ai fini della classificazione e dell'etichettatura e/o della valutazione dei rischi,
- fornire un'adeguata e attendibile copertura dei parametri chiave presi in considerazione nel metodo di prova corrispondente di cui all'articolo 13, paragrafo 3,
- contemplare una durata di esposizione comparabile o superiore a quella del metodo di prova corrispondente di cui all'articolo 13, paragrafo 3, se tale durata di esposizione costituisce un parametro pertinente, e
- essere corredati di una documentazione adeguata e attendibile del metodo applicato.

