

I test di genotossicità e la loro rilevanza nella valutazione tossicologica

Riccardo Crebelli
Istituto Superiore di Sanità

I test di genotossicità e la loro rilevanza nella valutazione tossicologica

- i) ruolo dei test a breve termine
- ii) strategie di saggio
- iii) interpretazione dei risultati
- iv) valutazione del rischio

I test di genotossicità e la loro rilevanza nella valutazione tossicologica

- **i) ruolo dei test a breve termine**
- ii) strategie di saggio
- iii) interpretazione dei risultati
- iv) valutazione del rischio

Per la gravità e irreversibilità degli effetti genetici, la verifica dell'attività genotossica è un elemento fondamentale nella valutazione del rischio delle sostanze chimiche.

Essa è normalmente ritenuta indispensabile per tutte le sostanze per le quali è prevedibile una esposizione umana.

Il paradigma del *Risk Assessment* (U.S. NAS 1983)

Hazard identification

Identificazione del pericolo:
l'agente induce effetti avversi?

Hazard characterization

Caratterizzazione del pericolo:
qual'è la relazione dose-risposta

Exposure assessment

Valutazione dell'esposizione:
qual è l'esposizione della
popolazione d'interesse?

Risk characterization

Caratterizzazione del rischio: qual è
l'incidenza o la gravità dell'effetto
avverso nella popolazione
d'interesse?

Il paradigma del *Risk Assessment* (U.S. NAS 1983)

Hazard identification

Identificazione del pericolo:

l'agente induce effetti avversi?

Hazard characterization

Caratterizzazione del pericolo:
qual'è la relazione dose-risposta

Exposure assessment

Valutazione dell'esposizione:
qual è l'esposizione della
popolazione d'interesse?

Risk characterization

Caratterizzazione del rischio: qual è
l'incidenza o la gravità dell'effetto
avverso nella popolazione
d'interesse?

Il paradigma del *Risk Assessment* (U.S. NAS 1983)

Hazard identification

Identificazione del pericolo:
l'agente induce effetti avversi?

Hazard characterization

Caratterizzazione del pericolo:
qual'è la relazione dose-risposta

Exposure assessment

Valutazione dell'esposizione:
qual è l'esposizione della
popolazione d'interesse?

Risk characterization

Caratterizzazione del rischio: qual è
l'incidenza o la gravità dell'effetto
avverso nella popolazione
d'interesse?

Obiettivi degli studi di mutagenesi (OECD, 1986)

1. identificazione delle sostanze capaci di indurre danni genetici nella progenie in seguito all'interazione con il materiale genetico delle cellule germinali (*hazard identification*) e stima quantitativa del danno genetico trasmissibile (*risk characterization*)
2. predizione dell'attività cancerogena conseguente alla interazione con il materiale genetico delle cellule somatiche (*hazard identification*)
3. valutazione del meccanismo d'azione (*MoA, mode of action*) di cancerogeni chimici (*risk characterization*)

Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 Aug;70(8):2281-5.
Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.

McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975
Dec;72(12):5135-9.
Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals.

Test di mutagenesi a breve termine (*Short term tests, STT*)

In vitro

- Test di mutazione nei batteri (forward & reverse)
- Test di mutazione genica su cellule di mammifero
- Test citogenetici (CA, SCE, MN)
- Test di danno/riparazione (UDS, comet)

In vivo

- Test citogenetici su cellule somatiche (midollo osseo, sangue) e germinali (spermatogoni, spermatociti)
- UDS nel fegato, comet in vari tessuti
- Mutazione genica in animali transgenici

OECD Test Guidelines – Health Effects

- **471** Bacterial Reverse Mutation Test (1997)
- **473** In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test (1997)
- **474** Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997)
- **475** Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test (1997)
- **476** In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997)
- **477** Genetic Toxicology: SLRL Test in *Drosophila melanogaster* (1984)
- **478** Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test (1984)
- **479** Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells (1986)
- **480** Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene Mutation Assay (1986)
- **481** Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Mitotic Recombination Assay (1986)
- **482** Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro (1986)
- **483** Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997)
- **484** Genetic Toxicology: Mouse Spot Test (1986)
- **485** Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay (1986)
- **486** Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo (1997)

Test a breve termine di uso routinario

In vitro

- Ames tes (OECD 471)
- Test di mutazione genica in cellule di mammifero (HPRT o tk) (OECD 476)
- Test di aberrazioni cromosomiche (OECD 473)
- Test del micronucleo (OECD 487)

In vivo

- Test di aberrazioni cromosomiche (OECD 475)
- Test del micronucleo (OECD 474)
- Test dell'UDS nel fegato del ratto (OECD 486)
- Comet assay in vivo

OECD 471. Ames test: controllo spontaneo vs trattato



OECD 476. Test di mutazione genica in cellule di mammifero

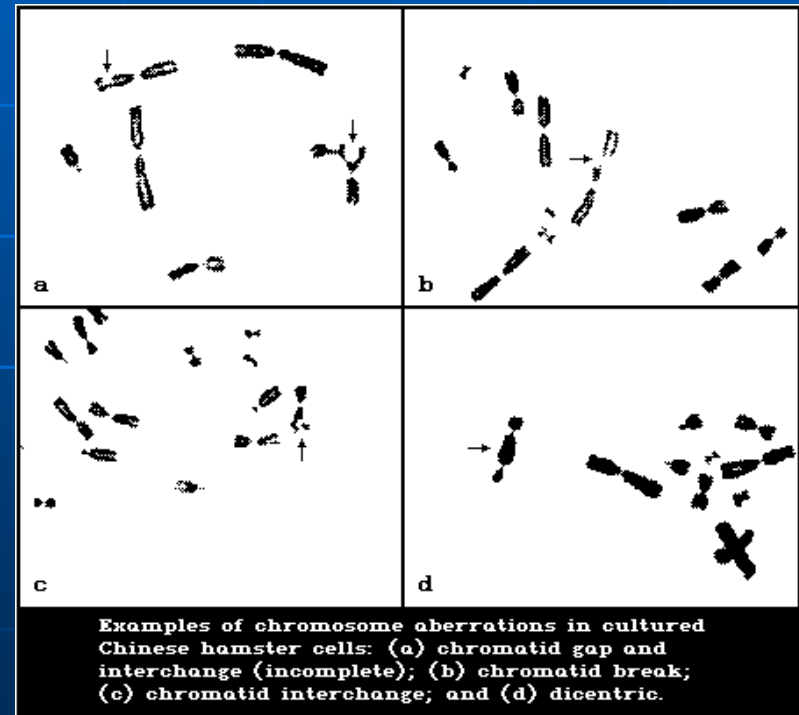
Mutazione in avanti a loci autosomici (thymidine kinase) o X-linked (HPRT)



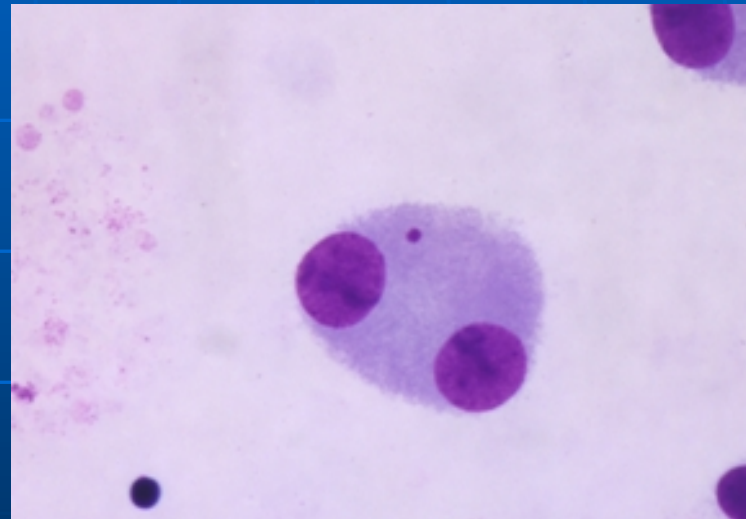
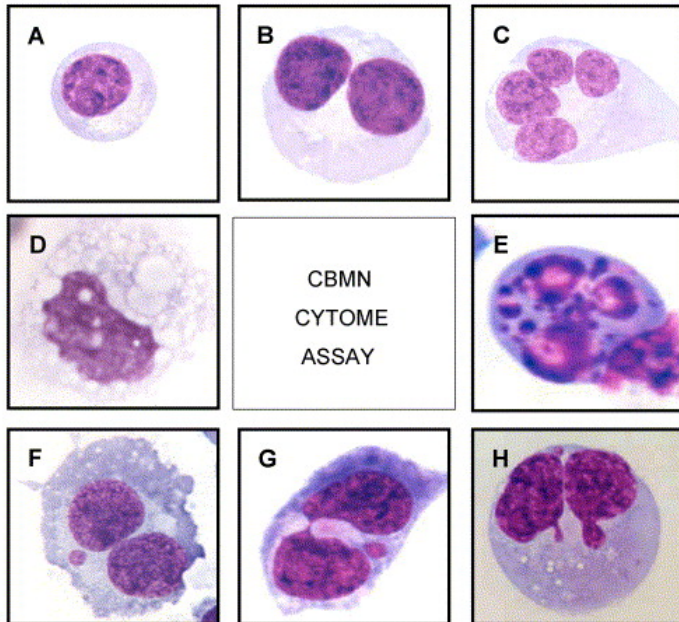
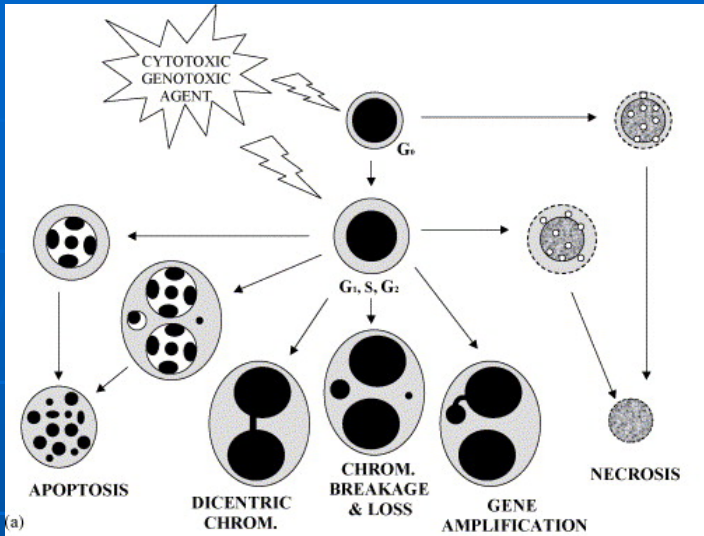
Colonie mutanti tk^{-/-} trifluorotimina resistenti selezionate da cellule di linfoma di topo L5178Y tk^{+/-}

OECD 473. Test di aberrazioni cromosomiche in vitro

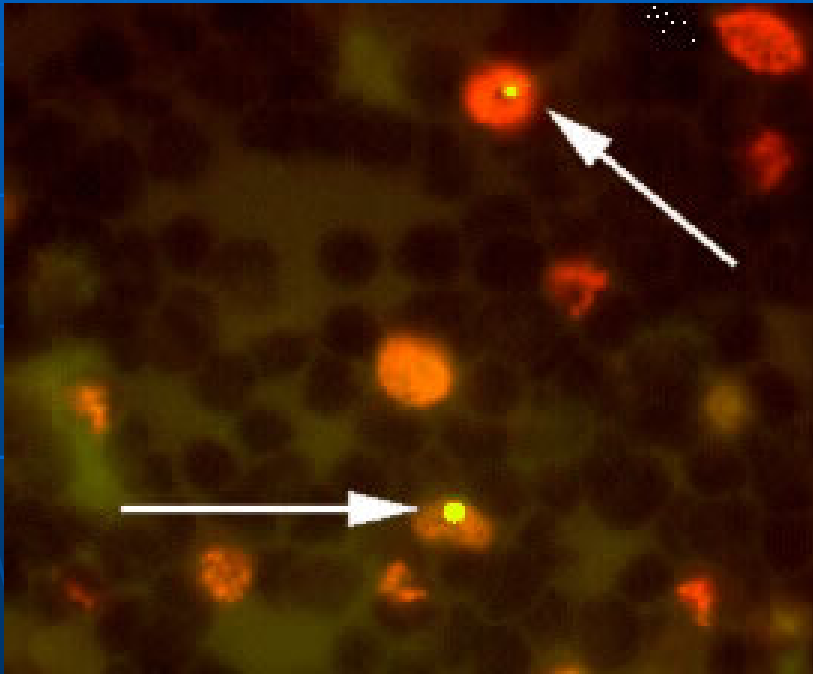
Alterazioni cromosomiche strutturali sono visualizzate nei cromosomi condensati in metafase



OECD 487. Test del micronucleo in vitro

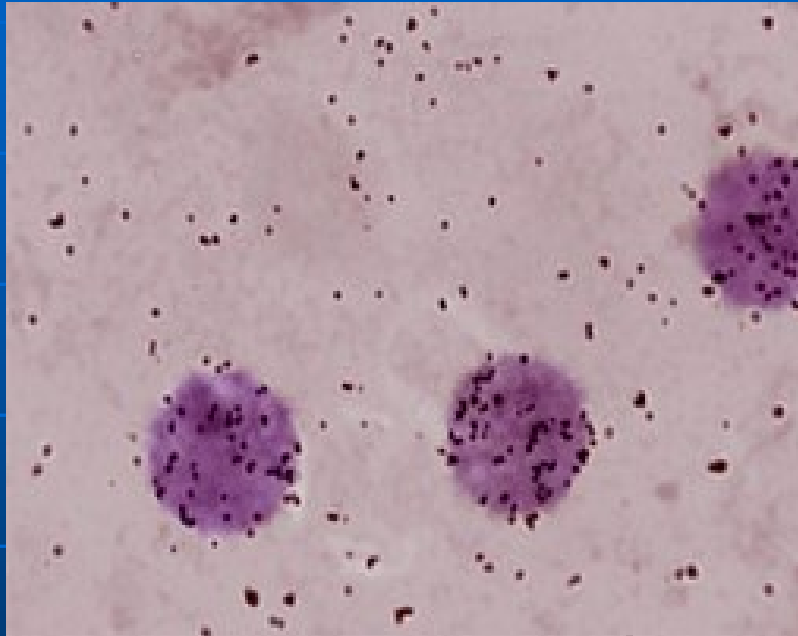


OECD 474. Test del micronucleo in cellule eritropoietiche in vivo



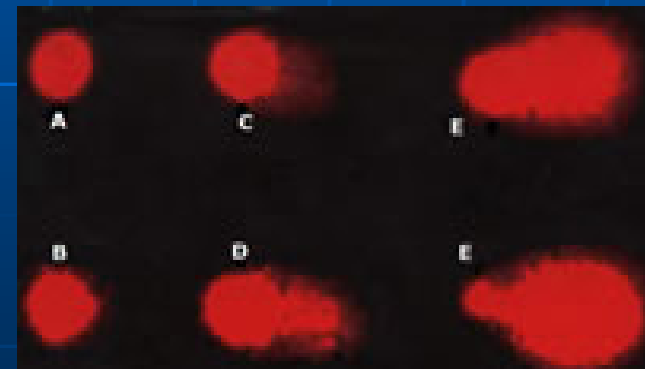
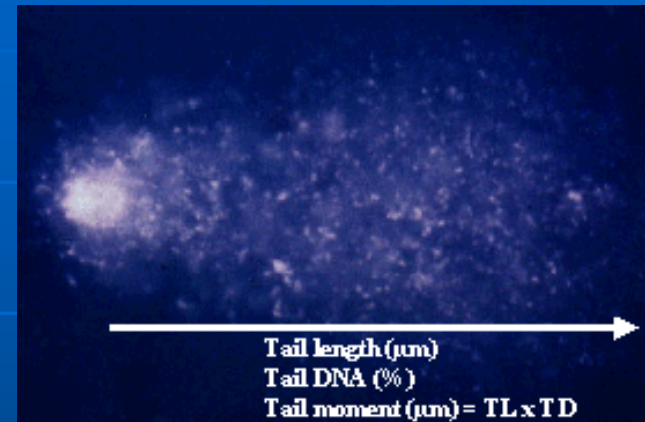
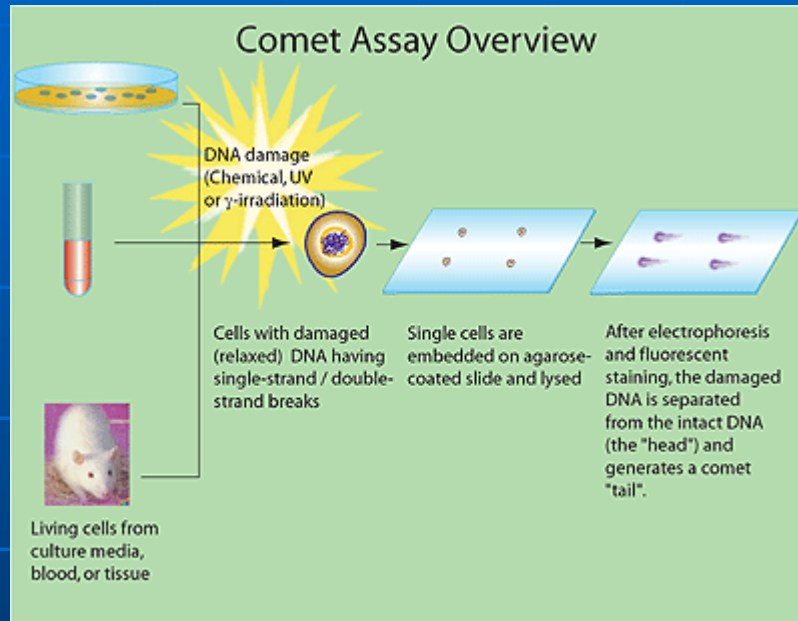
Micronuclei in reticolociti
di topo colorati con
arancio di acridina

OECD 486. Test dell'UDS (Unscheduled DNA Synthesis) nel fegato del ratto



- I grani mostrano l'incorporazione di timidina marcata in nuclei di epatociti di ratto in seguito a trattamento in vivo con un agente genotossico

Test della cometa (in vitro e in vivo)



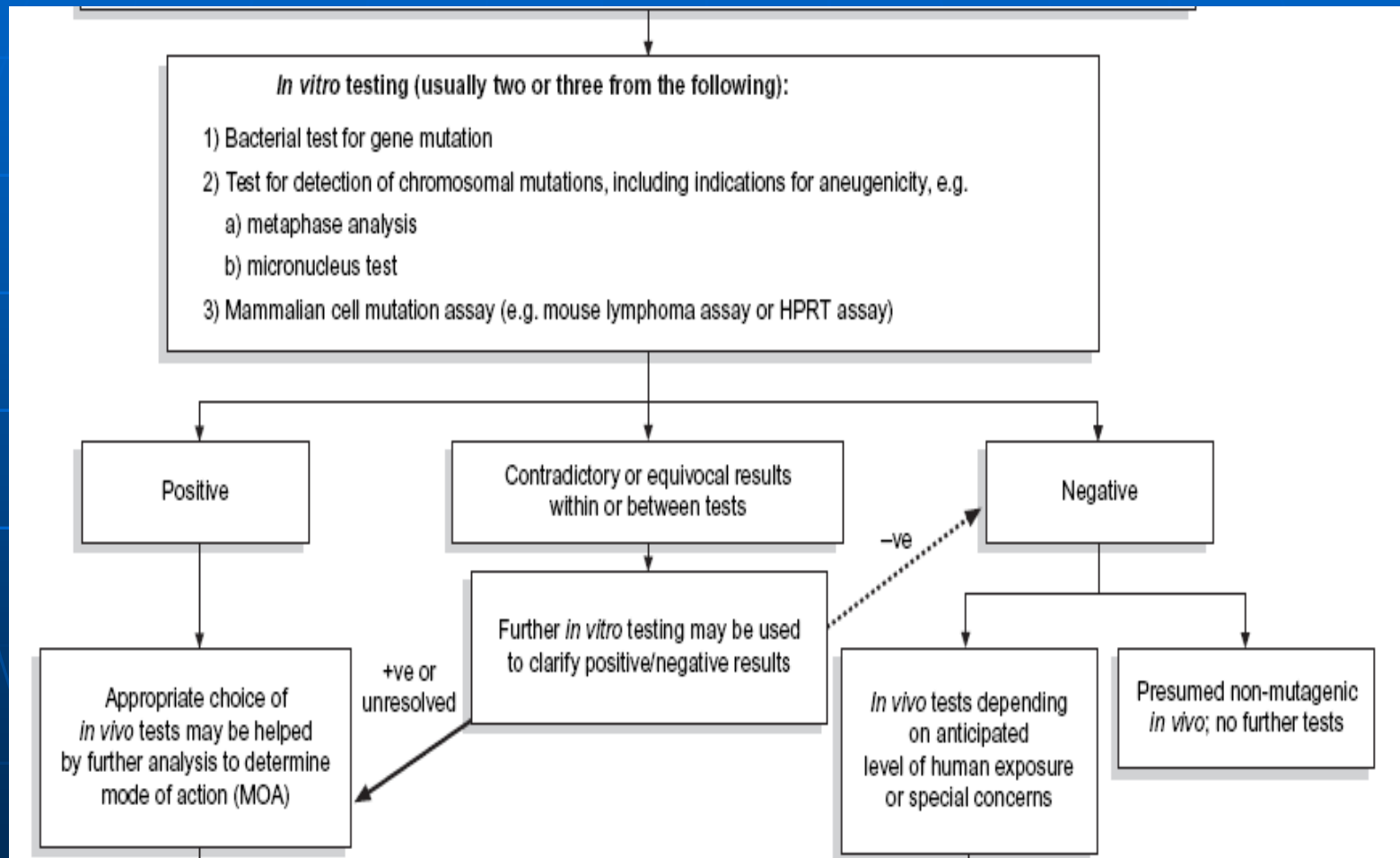
I test di genotossicità e la loro rilevanza nella valutazione tossicologica

- i) ruolo dei test a breve termine
- **ii) strategie di saggio**
- iii) interpretazione dei risultati
- iv) valutazione del rischio

Strategie di saggio – Considerazioni preliminari

- Mutazioni a tutti e tre i livelli (genico, cromosomico e genomico) sono implicate in sindromi ereditarie e cancerogenesi
- Quindi per adeguata valutazione del potenziale genotossico di una sostanza sono necessarie informazioni sull'attività mutagenica a livello genico, sull'induzione di aberrazioni cromosomiche e di aneuploidia
- Nessun sistema sperimentale può da solo fornire informazioni sui tre livelli di mutazione: in principio ciò può ottenersi con batterie di test complementari

WHO/IPCS Harmonized Scheme for Mutagenicity Testing: screening iniziale



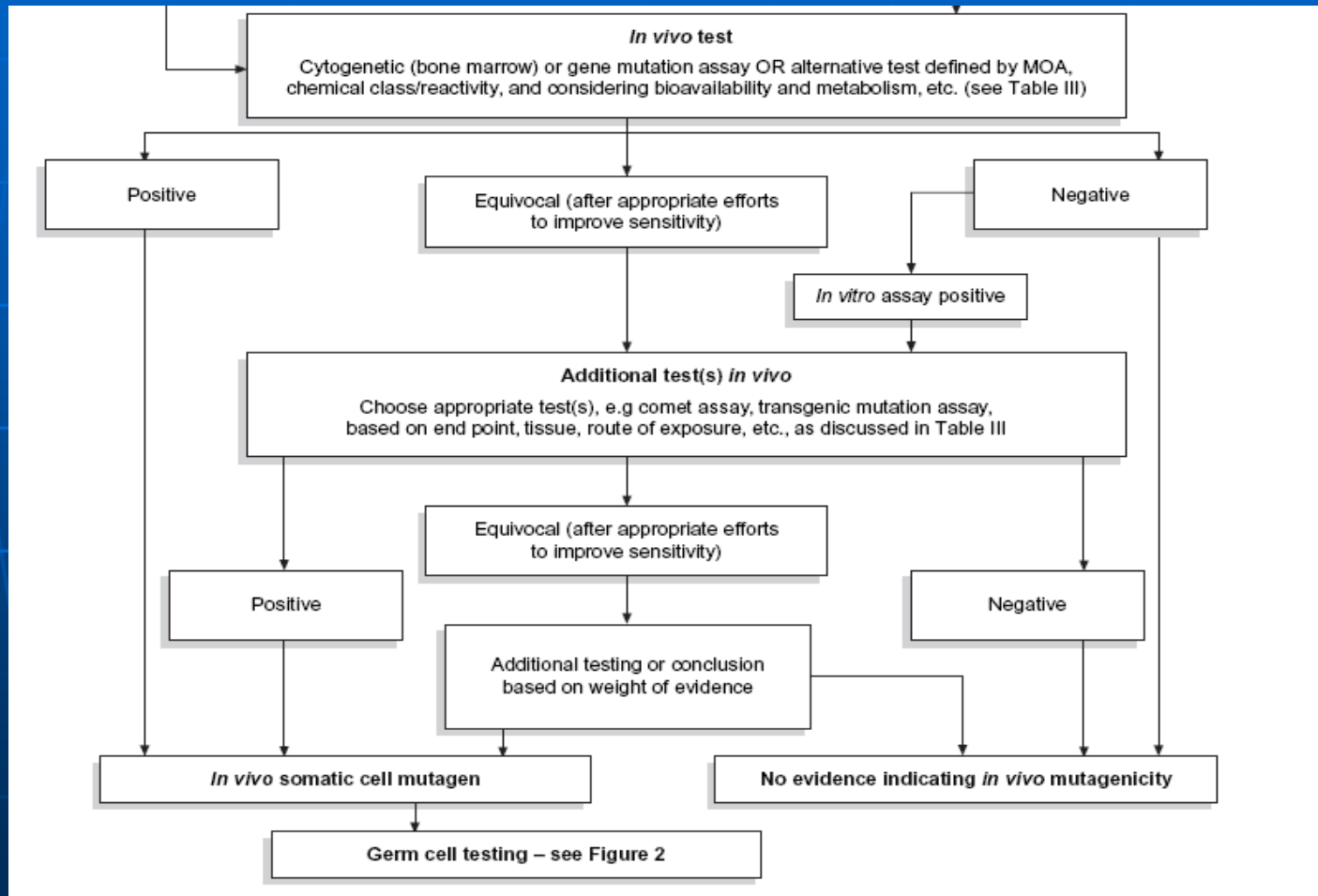
WHO/IPCS Harmonized Scheme for Mutagenicity Testing: screening iniziale

Al livello di screening iniziale sono normalmente impiegati due o tre test in vitro capaci di individuare mutazioni geniche e alterazioni cromosomiche strutturali e numeriche.

Normalmente non sono condotti test in vivo, a meno che non sia attesa una elevata esposizione umana o che i test in vitro siano ritenuti inadeguati in base a considerazioni metaboliche.

I saggi in vivo sono invece condotti in seguito a risultati positivi in vitro per verificarne la rilevanza (*in vivo follow-up*)

WHO/IPCS Harmonized Scheme for Mutagenicity Testing: follow-up in vivo



WHO/IPCS Harmonized Scheme for Mutagenicity Testing: follow-up in vivo

- Prima di intraprendere la sperimentazione è opportuno esaminare il profilo tossicocinetico/tossicodinamico e la reattività chimica della sostanza per verificare se il tessuto bersaglio in vivo sarà adeguatamente esposto.
- La scelta del test da effettuare è guidata dal profilo di attività osservato in vitro, e dalla necessità di assicurare una adeguata esposizione del tessuto bersaglio
- Se il primo test in vivo è negativo, la necessità di un secondo test è decisa caso per caso tenendo conto del tipo e della qualità dei dati già disponibili, dell'adeguatezza dell'esposizione del tessuto bersaglio nel primo test, della potenziale esposizione umana.

Follow-up in vivo 1.

Come default, per sostanze con disponibilità sistemica vengono raccomandati seguenti saggi:

- Un test citogenetico su cellule eritropoietiche di roditori (micronucleo su eritrociti o aberrazioni cromosomiche sulle cellule del midollo osseo);
- Un test di danno/riparazione del DNA (*UDS, unscheduled DNA synthesis*) nel fegato del ratto.

Follow-up in vivo 2.

Per sostanze reattive o instabili, senza indicazioni di disponibilità sistemica, gli studi dovrebbero riguardare anche il sito di primo contatto. Le principali metodologie adatte a tale scopo sono le seguenti:

- Test della cometa in vivo
- Test di mutazione genica in animali transgenici
- Determinazione del legame covalente al DNA

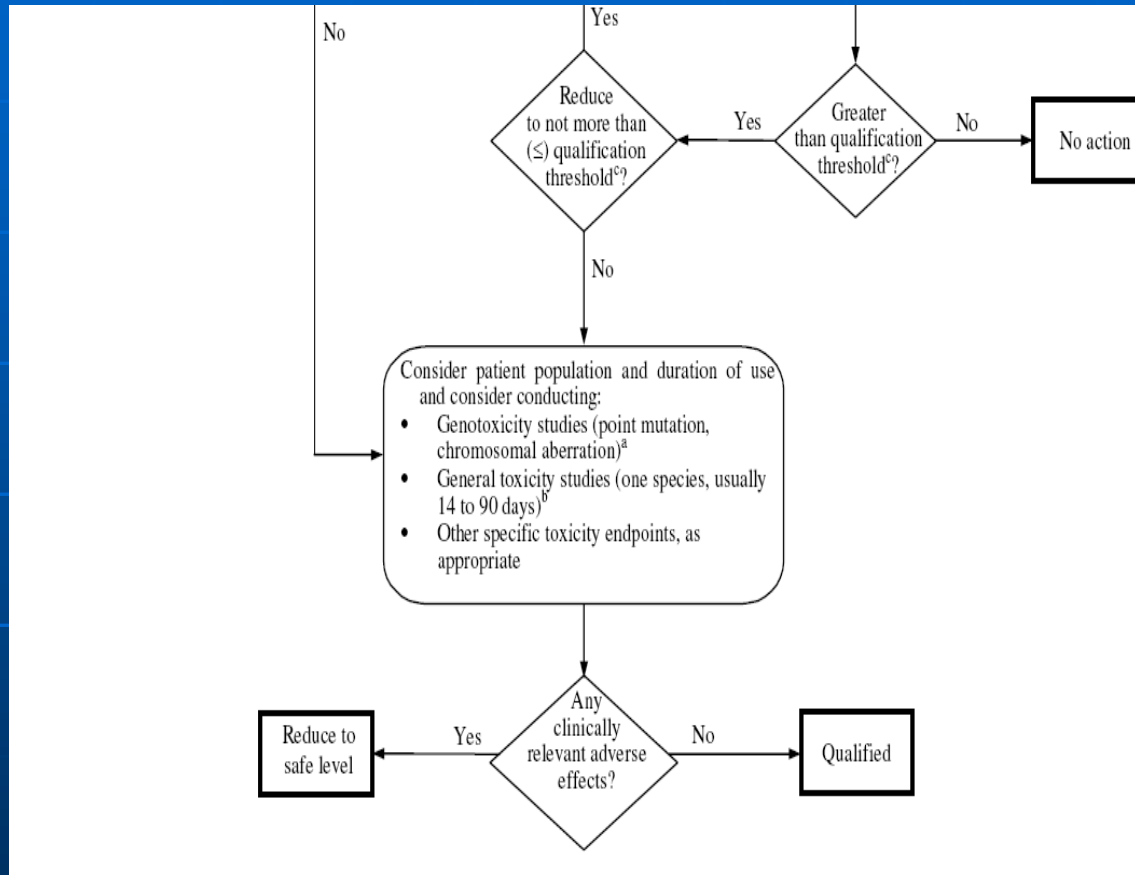
ICH Topic S2 (R1)
Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for
Pharmaceuticals
Intended for Human Use

Standard battery:

- i. A test for gene mutation in bacteria.
- ii. A cytogenetic test for chromosomal damage (the *in vitro* metaphase chromosome aberration test or *in vitro* micronucleus test), or an *in vitro* mouse lymphoma *tk* gene mutation assay.
- iii. An *in vivo* test for genotoxicity, generally a test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells, either for micronuclei or for chromosomal aberrations in metaphase cells.

ICH Topic Q 3 B (R2)

Impurities in New Drug Products



A study to detect point mutations and one to detect chromosomal aberrations, both in vitro, are considered an appropriate minimum screen (EMA 2006).

I test di genotossicità e la loro rilevanza nella valutazione tossicologica

- i) ruolo dei test a breve termine
- ii) strategie di saggio
- **iii) interpretazione dei risultati**
- iv) valutazione del rischio

Interpretazione e valutazione dei risultati dei test di genotossicità. 1

I risultati degli studi, sia in vitro e in vivo, vanno valutati in base al peso dell'evidenza sperimentale (*weight of evidence*) tenendo conto dell'entità dell'effetto, della relazione con la dose, della riproducibilità), dell'adeguatezza del protocollo, anche in relazione a possibili confondenti.

La plausibilità biologica va considerata prima della significatività statistica

Interpretazione e valutazione dei risultati dei test di genotossicità. 2

Molteplici risultati negativi in altri sistemi non eliminano la preoccupazione sollevata da un risultato chiaramente positivo in un altro saggio (in vivo): non è cioè possibile bilanciare risultati positivi e negativi perché sistemi di saggio diversi hanno diversa specificità di risposta

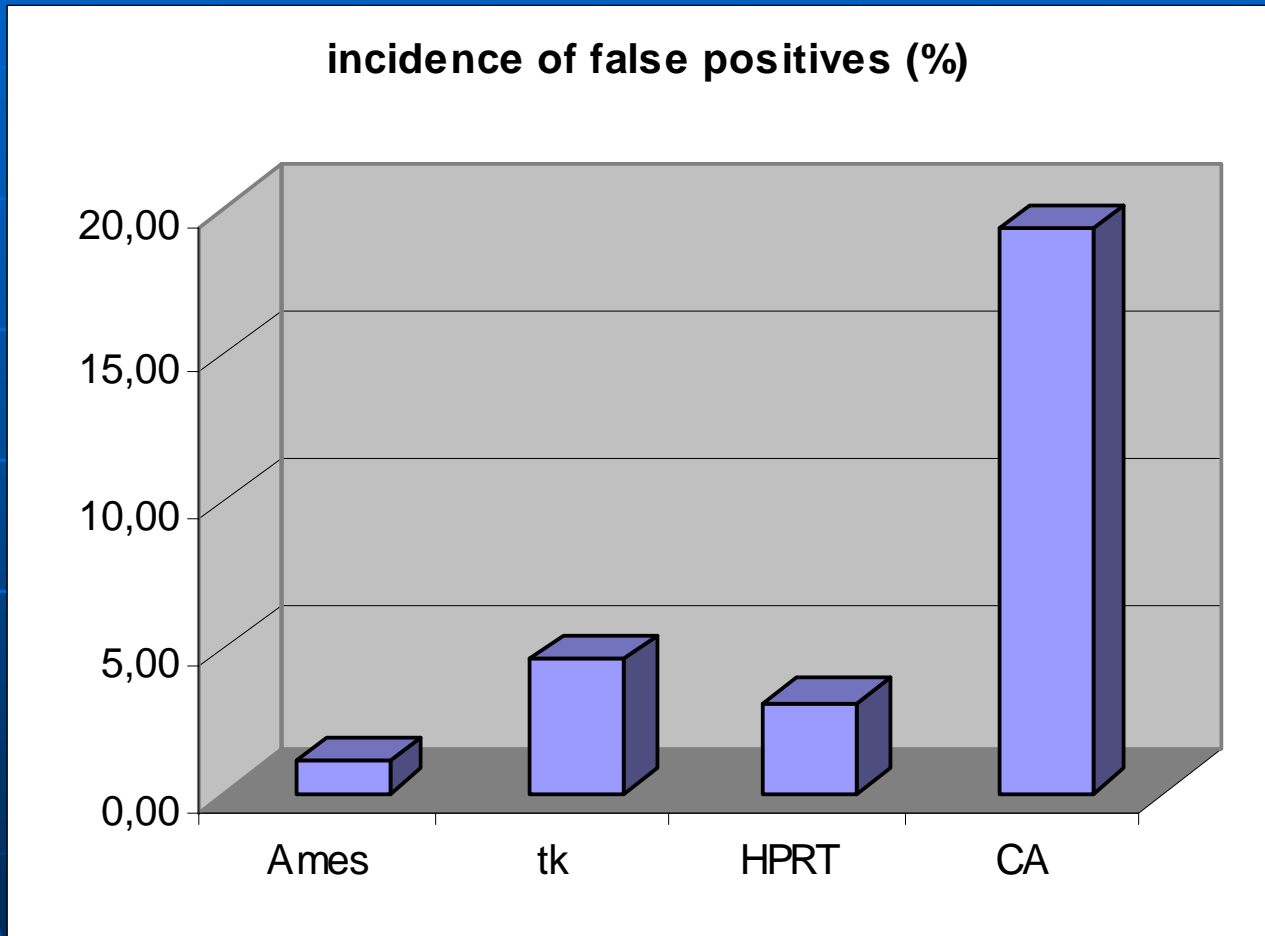
I test in vitro danno una indicazione di potenziale attività che richiede normalmente una verifica/conferma con test in vivo

Meccanismi di genotossicità in vitro indiretti, irrilevanti o con soglia

- Saturazione di pathway metabolici fisiologici ad alte dosi
- Saturazione di capacità detossificanti (produzione di ROS, perossidazione lipidica, -SH depletion)
- Formazione di metaboliti specifici per i batteri (Na azide, nitrocomposti)
- Deficienza nella capacità riparativa/controllo del ciclo cellulare
- Inibizione di DNA polimerasi, topoisomerasi, kinasi
- Deficit energetico, danni alle membrane (liberazione di nucleasi)
- Sbilanciamento del pool nucleotidico
- Inibizione della sintesi proteica/denaturazione proteine

(Kirkland, 2007)

Incidenza di risultati “falsi positivi” non confermati nel follow-up in vivo tra sostanze a contatto con gli alimenti



ICH Topic S2 (R1)
Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for
Pharmaceuticals
Intended for Human Use

Option 1

- i. A test for gene mutation in bacteria.
- ii. A cytogenetic test for chromosomal damage (the *in vitro* metaphase chromosome aberration test or *in vitro* micronucleus test), or an *in vitro* mouse lymphoma *tk* gene mutation assay.
- iii. An *in vivo* test for genotoxicity, generally a test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells, either for micronuclei or for chromosomal aberrations in metaphase cells.

Option 2

- i. A test for gene mutation in bacteria.
- ii. An *in vivo* assessment of genotoxicity with two tissues, usually an assay for micronuclei using rodent hematopoietic cells and a second *in vivo* assay.

I test di genotossicità e la loro rilevanza nella valutazione tossicologica

- i) ruolo dei test a breve termine
- ii) strategie di saggio
- iii) interpretazione dei risultati
- iv) **valutazione del rischio**

1. Predizione della cancerogenesi

	<i>Ames</i>	<i>MLA</i>	<i>MN</i>	<i>CA</i>
Sensibilità (% cancerogeni positivi)	58.8	73.1	78.7	65.6
Specificità (% non-cancerogeni negativi)	73.9	39.0	30.8	44.9
Predittività positiva (% cancerogeni tra i positivi)	87.4	73.6	79.5	75.4
Predittività negativa (% di non-cancerogeni tra i negativi)	36.9	38.3	29.6	33.5

Attività mutagena di 700 cancerogeni e non cancerogeni in 4 STT in vitro (Kirkland, 2005)

Sensibilità e specificità di batterie di STT nella predizione della cancerogenesi

	Sensibilità (% cancerogeni positivi)	Specificità (% non cancerogeni negativi)
Ames + CA	75.3	34.6
Ames + MLA	81.0	32.4
Ames + CA + MLA	84.7	22.9

STT in vitro e predizione della cancerogenesi: conclusioni

- Gli STT in vitro hanno buona sensibilità ma scarsa specificità: i risultati positivi vanno quindi confermati/verificati in un sistema in vivo.
- L'assenza di proprietà genotossiche non indica necessariamente la non-cancerogenicità, per l'esistenza di meccanismi di cancerogenesi di tipo non genotossico.

2. valutazione quantitativa del rischio

- I risultati dei test di genotossicità non sono direttamente utilizzabili per la stima quantitativa del rischio (a parte gli effetti trasmissibili)
- La valutazione del rischio per gli agenti genotossici si basa su dati di cancerogenesi nell'animale (v. TTC)
- L'evidenza di genotossicità ha un ruolo determinante per la valutazione del rischio alle basse dosi per le informazioni che essa fornisce sul possibile meccanismo d'azione

Il dogma LNT*

Per alcuni effetti genotossici (p.es. quelli conseguenti ad alterazioni del fuso mitotico, inibizione delle topoisomerasi e della sintesi del DNA, sovraccarico metabolico, stress ossidativo) è attesa/dimostrata una soglia nella relazione dose-risposta,

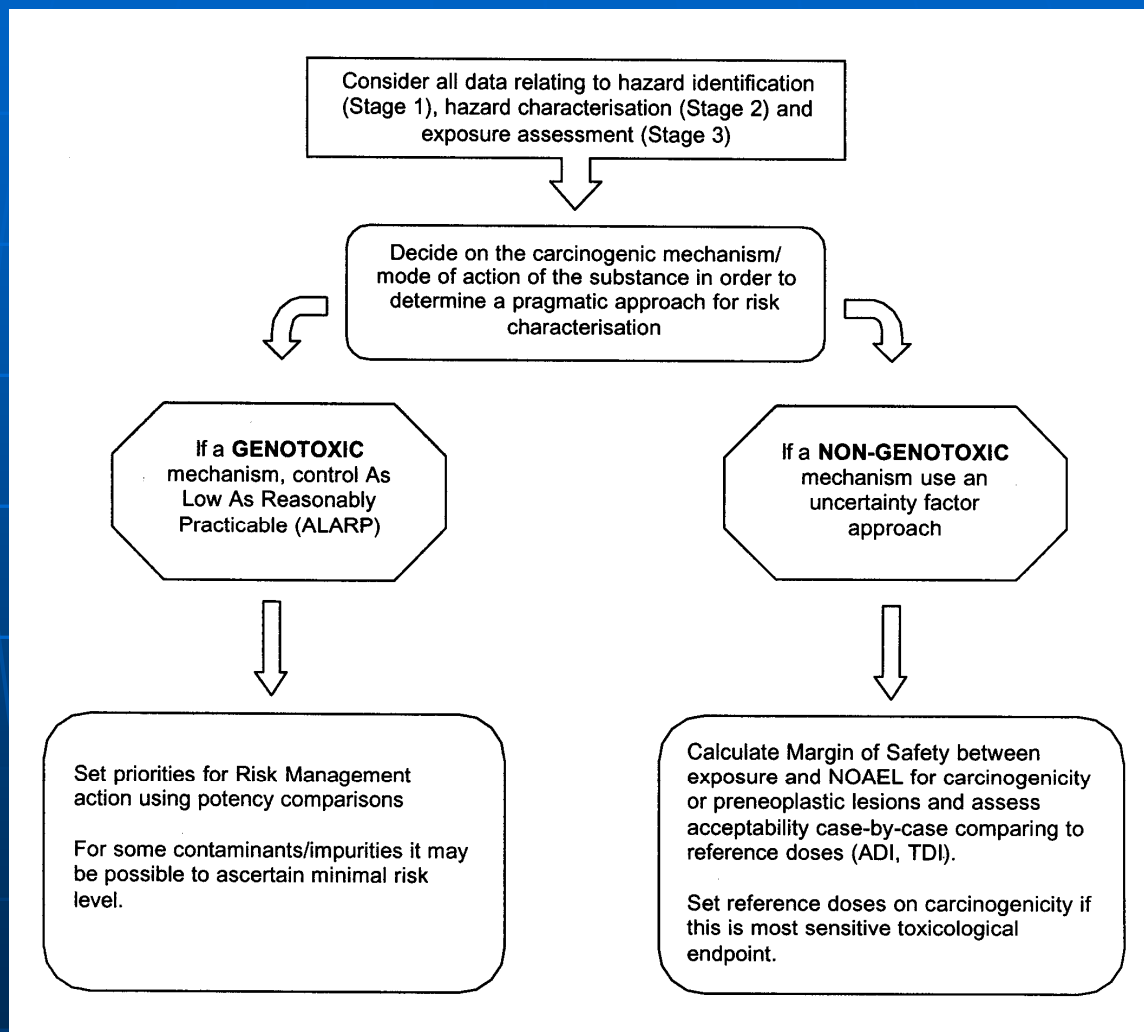
Per analogia con il meccanismo *one-hit* delle radiazioni ionizzanti, è invece postulata l'assenza di soglia per effetti mutageni risultanti dalla interazione covalente dell'agente con il DNA

**Linear No Threshold*

Valutazione del meccanismo d'azione dei cancerogeni e rischio alle basse dosi

- L'evidenza di genotossicità viene quindi ad assumere una influenza determinante nella valutazione del rischio cancerogeno alle basse dosi.
- Tradizionalmente ai cancerogeni con evidenza di reattività con il DNA viene attribuito un meccanismo d'azione privo di soglia, e il rischio alle basse dosi calcolato con modelli LNT (o comunque più conservativi rispetto ai cancerogeni non genotossici)

Le autorità regolatorie impiegano approcci diversi per regolamentare agenti cancerogeni in base alla presenza/assenza di proprietà genotossiche



Evidenze supportive per un meccanismo genotossico nell'induzione del tumore (in ordine decrescente di rilevanza)

- Mutazioni geniche in oncogeni/geni oncosoppressori nel tessuto bersaglio dell'effetto cancerogeno
- Mutazioni geniche in altri loci nel tessuto bersaglio
- Addotti al DNA (con proprietà miscodificanti) nel tessuto bersaglio
- Evidenza di danno genotossico (comet, UDS, ssb) nel tessuto bersaglio
- Mutazioni geniche , addotti al DNA e altri danni genotossici in vivo in tessuti diversi
- Evidenza di attività mutagena/genotossica in vitro

(U.S. EPA Cancer Guidelines, 2007)

Argomenti a favore di una soglia per gli effetti genotossici risultanti dalla interazione diretta con il DNA

- Riparazione enzimatica del danno al DNA (favorita dal basso tasso di replicazione in vivo)
- By-pass *error free* della lesione
- Eliminazione delle cellule danneggiate per apoptosi
- Soppressione fenotipica attraverso giunzioni intercellulari (gap junctions)

Genotossicità e rischio alle basse dosi: conclusioni

- Esistono plausibili argomenti a favore di un possibile andamento sublineare nella relazione dose-risposta a basse dosi anche per le sostanze reattive con il DNA, compresi quindi i cancerogeni genotossici
- Una soglia pratica è stata dimostrata sperimentalmente in alcuni dei casi studiati, ma in altri l'andamento si mantiene lineare
- Indipendentemente dall'esistenza di una vera dose soglia senza effetto, anche assunto un meccanismo LNT può essere teoricamente identificata una soglia pratica in cui l'effetto – se presente – contribuisce in modo trascurabile al background spontaneo
- Per le impurezze genotossiche dei farmaci la soglia proposta è associata ad un rischio incrementale massimo di circa $1/100.000^*$, che contribuisce in modo trascurabile al rischio individuale di cancro che è di circa 0,25

**Stimato LNT*