

Corso di Laurea Magistrale in
“**BIOLOGIA PER LA SOSTENIBILITÀ**”

Anno Accademico 2023-2024



Igiene del'ambiente e del territorio

Prof.ssa Valeria Di Onofrio

valeria.dionofrio@uniparthenope.it



SIS

Scuola Interdipartimentale
delle **Scienze**, dell'**Ingegneria**
e della **Salute**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE (DIST)

TIPI DI STUDI DI TOSSICITÀ

- Tossicità generale
- Tossicità specifica: teratogenesi, riproduttiva, mutagenesi, cancerogenesi, immunitaria, locale, comportamentale

STUDI DI TOSSICITÀ GENERALE

- ✓ acuta: singola somministrazione;
- ✓ a breve termine (dosi ripetute): 14-28 giorni;
- ✓ prolungata (10-25 % della vita dell'animale, subcronica): 3-6 mesi (nel ratto)
- ✓ cronica (> 50% della vita): 1-2 anni nel ratto (in genere studi di cancerogenesi)

In termini di esposizione umana:

- gli **studi acuti** ‘rappresentano’ l’esposizione dovuta ad incidenti o a sovradosaggi accidentali o volontari.
- gli **studi subcronici** ‘rappresentano’ l’esposizione (a livelli più bassi di quelli dovuti ad incidenti) **frequente** a sostanze di uso professionale (es. solventi) o domestico (es. detergenti), a additivi alimentari, farmaci e inquinanti ambientali;
- gli **studi cronici** ‘rappresentano’ l’esposizione **giornaliera, per tutta la vita**, di additivi alimentari, residui di pesticidi nel cibo e nell’acqua ecc.

TOSSICITÀ ACUTA

- ✓ Singola somministrazione (o più somministrazioni in 24 ore). Osservazioni fino a 14 giorni dalla somministrazione: mortalità, segni clinici di tossicità.
- ✓ Sono richiesti dalle Autorità Regolatorie per nuove sostanze chimiche, farmaci, pesticidi.

TOSSICITÀ ACUTA

Obiettivi:

- ✓ **Curve di letalità** e relativi parametri (pendenza e forma della curva)
- ✓ Stima quantitativa della **potenza tossica** della sostanza (DL50 o intervallo in cui cade la DL50; es. 5-50 mg/kg) ⇒ indicazioni sulla **tossicità acuta nell'uomo** (intossicazione accidentale o volontaria, sovradosaggio) ⇒ limiti e precauzioni.

DL₅₀ è l'acronimo di *"Dose Letale₅₀"*

Dose di una sostanza, somministrata in una volta sola, in grado di uccidere il 50% (cioè la metà) di una popolazione campione di cavie

Classificazione UE (Etichettatura delle Sostanze pericolose)

DL50 orale, ratto (mg/kg)	DL50 cutanea, ratto o coniglio (mg/kg)	DL50 inalatoria ratto (mg/lit/4 ore)	Classe di tossicità
≤ 25	≤ 50	≤ 0,5	Molto tossico
25 - 200	50 - 400	0,5 - 2	Tossico
200 - 2.000	400 - 2.000	2 - 20	Nocivo

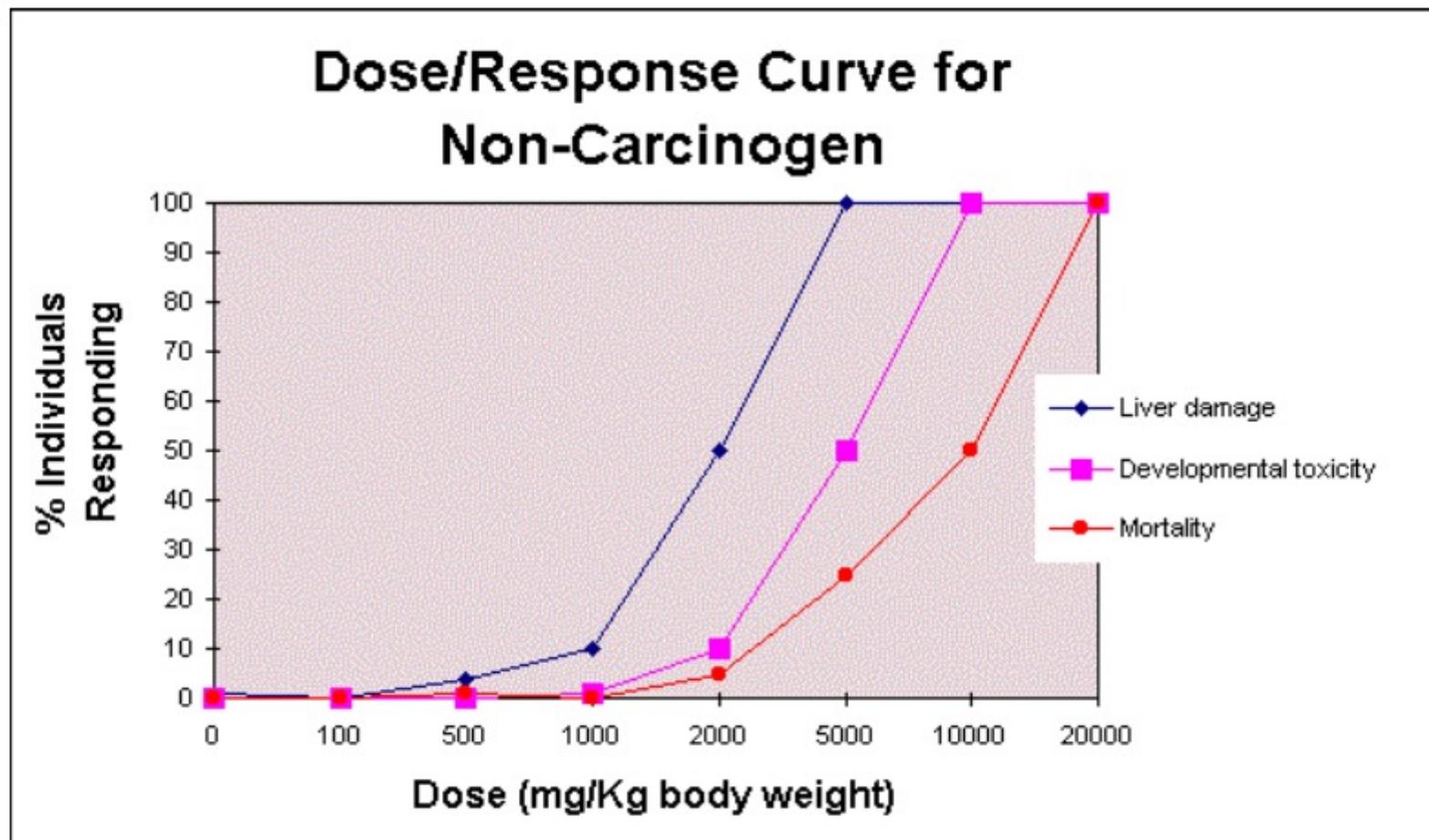
Sostanze con DL50 maggiori non hanno bisogno di etichettatura.

La classificazione impone precauzioni nella lavorazione, trasporto ecc. delle sostanze.

TOSSICITÀ ACUTA

- ✓ Identificazione degli organi/sistemi bersaglio (N.B. gli organi bersaglio della tossicità acuta possono essere diversi da quelli della tossicità cronica; es: anestetici alogenati). Curve dose-risposta per effetti tossici a carico di specifici organi/sistemi.
- ✓ Dosi soglia: NOEL (*No Observed Effect Level*) o NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*); LOEL (*Lowest Observed Effect Level*) o LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*). Servono anche per determinare le dosi da usare negli studi di tossicità ripetuta.

Le curve dose-risposta variano con l'effetto tossico osservato \Rightarrow anche le dosi soglia variano.



CURVE DI LETALITÀ

determinazione della DL50 e della pendenza della curva

- ✓ Studi “classici”. Somministrazione di dosi pre-fissate, con rapporto costante tra dosi successive (es: $D2/D1=2$). Almeno 3 dosi devono dare letalità nella parte ‘rettilenea’ della curva.
- ✓ Si calcola la pendenza della curva e si estrapola la DL50.
- ✓ In genere utilizzate 4 o più dosi, somministrate a gruppi di 10 animali (di entrambi i sessi) per dose (in media 50 animali per determinare la DL50).

Successivamente, si sono sviluppati disegni sperimentali che consentono di ridurre notevolmente il numero di animali.

Ad es., un animale riceve una prima dose:

- ✓ se l'animale muore, si somministra ad un secondo animale una dose minore (ridotta di un fattore costante);
- ✓ se il primo animale non muore, si somministra al secondo animale una dose maggiore (aumentata di un fattore costante). Si procede fino a testare 5 animali.
- ✓ Si effettua una stima della DL50 con metodi statistici
- ✓ Con questo **disegno sequenziale** occorrono in media 6-9 animali per determinare la DL50.

TOSSICITÀ ACUTA

Altri tipi di disegni sperimentali non hanno come *endpoint* la morte. Es.: Tossicità acuta a dose fissa: si somministrano dosi pari a 5, 50, 200, 2000 mg/kg. Si osserva la comparsa di segni evidenti di tossicità.

Test limite: si pre-determina una dose limite (in genere sulla base della prevedibile esposizione umana o ambientale); se non si osserva mortalità a quella dose \Rightarrow DL50 > dose limite.

Con qualsiasi disegno sperimentale, non ha senso testare dosi orali > 5 g/kg, dosi cutanee > 2 g/kg, dosi inalatorie > 50 mg/m³.

TOSSICITÀ ACUTA

Effetti tossici a carico di organi/sistemi. Si rilevano mediante **analisi ed osservazioni dei segni clinici.**

- ✓ Ematologia: ematocrito, conta eritrocitaria, conta leucocitaria, emoglobina
- ✓ Analisi chimico-cliniche sul sangue (elettroliti, glucosio, azotemia, transaminasi, proteine, bilirubina) e sulle urine (pH, proteine, sedimento, glucosio, corpi chetonici ecc.)

TOSSICITÀ ACUTA

Segni clinici

- **Sistema Nervoso**: tremore, eccitazione, sedazione, riflessi
- **Cardiovascolare**: frequenza cardiaca, aritmie; Vasodilatazione/costrizione; ipertermia/ipotermia
- **Respiratorio**: apnea, dispnea, cianosi ecc.
- **Digestivo**: vomito, costipazione, diarrea
- **Urogenitale**: diuresi, anuria, poliuria
- **Cute e annessi**: piloerezione, edema, eritema, alopecia, necrosi ecc.

TOSSICITÀ ACUTA

- ✓ **Periodo di osservazione:** deve essere adeguato a mettere in luce i danni ai tessuti e agli organi (tossicità immediata o ritardata) e l'eventuale ritorno delle condizioni dell'animale alla norma (reversibilità dell'effetto); **la durata è abitualmente di 14 giorni**, e comunque **mai inferiore a 7 giorni** e può proseguire per tutto il tempo in cui persistono i segni di tossicità.
- ✓ Durante questo periodo si compiono le osservazioni (animali morti, segni di tossicità, analisi sangue e urine). Alla fine, si esegue l'autopsia su tutti gli animali.

TOSSICITÀ ACUTA

Specie animali

Ai fini regolatori, sono in genere richieste prove su almeno due specie di mammiferi, di ceppo noto. In genere sono utilizzati ratto e topo.

Via di somministrazione

In genere richieste due vie di somministrazione, di cui una è quella prevista nell'uomo (orale, inalatoria, cutanea) ed una assicuri assorbimento completo (parenterale).

STUDI DI TOSSICITÀ GENERALE DOPO ESPOSIZIONI RIPETUTE

Permettono di evidenziare:

- ✓ effetti tossici che occorrono, a dosi più basse di quelle degli studi acuti, per accumulo del tossico e/o accumulo del danno;
- ✓ effetti tossici ritardati (cancerogenesi, neuropatia ritardata da organofosforici ecc.).

L'endpoint non è la mortalità, ma la morbilità.

Le dosi usate sono notevolmente più basse di quelle usate negli studi di tossicità acuta.

TOSSICITÀ DA ESPOSIZIONI RIPETUTE

L'organo bersaglio della tossicità prolungata può essere diverso di quello della tossicità acuta (es. etanolo).

Anche se l'organo bersaglio è lo stesso, gli effetti cronici sono diversi da quelli acuti.

EFFETTI ACUTI E CRONICI A CARICO DI ALCUNI SISTEMI

	Acute Effects	Chronic Effects
Respiratory	Irritation, coughing, choking tightness in chest	Emphysema, lung cancer
Renal	Proteinuria, increased urination, acute renal failure	Decreased glomerular filtration, chronic renal failure
Neurological	Headache, dizziness, confusion, convulsions, coma, death	Learning disorders, depression, mood disorders, peripheral neuropathies
Reproductive	Infertility, miscarriage, birth defects	Early onset menopause, testicular and ovarian cancers
Hepatic	Altered serum enzymes, cholestasis	Cirrhosis, hepatic cancer
Cardiovascular	Arrhythmias, hypertension, hypotension	Cardiomyopathy, atherosclerosis, peripheral vascular disease
Dermatological	Rashes, itching, redness, swelling	Chloracne, hyper- and hypo-pigmentation, skin cancer

Gli effetti dell'esposizione cronica possono manifestarsi come patologie spontanee (es. tumori, diabete ecc.), anche nell'uomo.

TOSSICITÀ DA ESPOSIZIONI RIPETUTE

Studi di tossicità generale dopo esposizioni ripetute:

- ✓ a breve termine (dosi ripetute, subacuta): 7-28 giorni;
- ✓ prolungata o subcronica (10-25 % della vita dell'animale): 3-6 mesi (nel ratto)
- ✓ cronica (> 50% della vita): 1-2 anni nel ratto (in genere studi di cancerogenesi)

TOSSICITÀ DA ESPOSIZIONI RIPETUTE

Studi di tossicità subcronica (10-25 % della vita dell'animale, 3-6 mesi nel ratto): consentono di evidenziare quasi tutti gli effetti tossici dovuti ad esposizione prolungata; la loro predittività si è dimostrata uguale a quella di studi di più lunga durata (cronici, 1-2 anni nel ratto), **tranne che per gli effetti cancerogeni.**

TOSSICITÀ DA ESPOSIZIONI RIPETUTE

Obiettivi:

- ✓ determinare natura degli effetti tossici ed organi bersaglio
- ✓ **determinare NOEL e LOEL**



Limiti di esposizione e precauzioni

STUDI DI TOSSICITÀ SUBCRONICA

Dosi. Per determinare NOAEL e LOAEL, si utilizzano (almeno) tre dosi:

- ✓ una dose che determini la comparsa di tossicità;
- ✓ una non produca effetti tossici;
- ✓ una dose intermedia.

Osservazioni post-mortem.

- ✓ Necropsia per alterazioni morfologiche evidenti degli organi
- ✓ Peso degli organi
- ✓ Analisi istologica

Servono per identificare **organo bersaglio**, regione colpita, tipo di tossicità

SPECIE ANIMALI

In genere sono richiesti studi su almeno 2 specie, di cui una non roditore.

La specie non roditore viene scelta sulla base della risposta:

- ✓ più possibile simile a quella nell'uomo (cane, scimmia); *oppure*
- ✓ specie più sensibile ad effetto tossico. es.: conigli per studi di irritazione cutanea e teratogenesi; cavia per studi di tossicità immunologica.

Gli studi di **tossicità cronica** (>50% della vita, 1-2 anni nel ratto) servono per:

- ✓ composti (es. **additivi alimentari, contaminanti di alimenti ed acqua**) per i quali si può supporre un'esposizione 'controllabile' nell'uomo per tutta la vita; gli studi di tossicità cronica a **2 anni** (nel ratto) forniscono una **stima più affidabile** dei **limiti di esposizione accettabili** nell'uomo. Le dosi sono scelte in base all'esposizione prevista nell'uomo.
- ✓ studi di cancerogenesi (2 anni nel ratto)

STUDI CRONICI (NON CANCEROGENESI)

Dosi: per composti relativamente non tossici si usano dosi 100-200 volte più elevate di quelle previste nell'uomo. Per composti per i quali queste dosi sono troppo alte (mortalità prima della fine dello studio) la dose più alta è la massima dose tollerata (MTD); è la dose che provoca una riduzione dell'aumento di peso non superiore al 10%; produce un qualche effetto tossico, ma non causa mortalità né riduce la durata di vita dell'animale. Le altre dosi sono in genere $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ della dose più alta.

CONTROLLI

Sia per gli studi subcronici che cronici è necessario avere un gruppo di controllo, perché:

- ✓ diversi effetti tossici (patologie) si sviluppano spontaneamente (soprattutto tumori);
- ✓ per assicurare che gli effetti osservati siano dovuti alla sostanza e non a fattori ambientali e/o sperimentali.

METODOLOGIE

I risultati degli studi possono dipendere dalle modalità sperimentali.

Studi sulla stessa sostanza, condotti da gruppi diversi, possono fornire risultati diversi, a volte contrastanti.

Ciò rende difficile la valutazione del rischio.

IMPUREZZE

- ✓ La tossicità di un farmaco è influenzata dalle impurezze.
- ✓ Le normative internazionali prevedono che se un'impurezza è presente in quantità superiore a limiti prefissati (dipendenti dalla dose terapeutica), essa deve essere identificata o caratterizzata dal punto di vista farmaco-tossicologico (*qualification*)

METODOLOGIE SPERIMENTALI

Via orale: è la più semplice e quindi la più utilizzata. La sostanza viene mescolata al cibo o aggiunta all'acqua. **Occorre verificare compatibilità, stabilità e accettabilità.**

Vie parenterali. Sono in genere limitate a studi acuti o a breve termine, per i possibili danni e lo stress causato dalle somministrazioni.

METODOLOGIE SPERIMENTALI

Via inalatoria. Tecnicamente più impegnativa ma necessaria per sostanze volatili ed aerosol.

Generazione di vapori.

Metodi statici: il liquido da testare viene posto nella camera di esposizione e lasciato equilibrare \Rightarrow tutti i componenti volatili si accumulano (fino a saturazione) nella fase vapore.

Metodi dinamici: il liquido da testare viene posto esternamente alla camera di esposizione; si fa passare aria, che viene convogliata alla camera.

La scelta del metodo può influenzare la composizione in impurezze del vapore inalato.

Con i metodi dinamici i componenti più volatili (impurezze) sono presenti nella fase vapore in misura percentualmente minore rispetto al vapore generato con metodo statico.

METODOLOGIE SPERIMENTALI

Generazione di aerosol: dimensioni del particolato e condizioni di aerazione.

Il punto di deposizione delle particelle in sospensione lungo l'albero respiratorio dipende dalla loro velocità di sedimentazione, e quindi dalle dimensioni delle particelle.

Tanto più piccole sono le particelle tanto più in profondità penetrano nell'albero respiratorio.

Particelle con diametro $< 1 \mu\text{m}$ vengono in buona parte esalate senza depositarsi.

METODOLOGIE SPERIMENTALI

Specie: una o più specie, con metabolismo simile all'uomo (necessari studi preventivi o conoscenze su metabolismo di composti strutturalmente correlati).

Ceppo: vi possono essere ceppi particolarmente sensibili o particolarmente resistenti, per fattori metabolici (sovra-espressione o carenza di particolari enzimi).

Condizioni di stabulazione. È importante che gli animali siano stabulati in condizioni ottimali e controllate di temperatura, umidità relativa, ciclo luce/buio. Cibo ed acqua devono rispondere a standard di qualità. Alcuni tipi di tossicità variano se l'animale è stabulato in gabbia individuale o in gruppo.

METODOLOGIE SPERIMENTALI

Controlli negativi: importanti soprattutto per effetti con bassa incidenza o gravità e per effetti che si manifestano spontaneamente.

Controlli positivi: per verificare la sensibilità della specie e del ceppo e la correttezza dei metodi, in alcuni tipi di studi (es. cancerogenesi) si possono utilizzare i controlli positivi, animali trattati con una sostanza che causa sicuramente l'effetto tossico studiato.

METODOLOGIE SPERIMENTALI

Statistica.

I test statistici consentono di verificare, con un determinato grado di probabilità, se la differenza osservata (tra trattati e controlli) è dovuta al caso o al trattamento. Il **numero di animali** dovrebbe essere pre-determinato in base all'entità della differenza e delle variabilità previste.

N.B.: uno studio può dare un risultato statisticamente significativo ma biologicamente poco importante. Viceversa, risultati statisticamente non significativi (per esiguità del numero di animali o altre cause sperimentali) ma con grande importanza biologica potenziale \Rightarrow necessità di ulteriori studi.