

Corso di Laurea Magistrale in
“BIOLOGIA PER LA SOSTENIBILITÀ”

Anno Accademico 2022-2023



IGIENE DELL'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)

Materiale didattico - D.M. 752 del 30/06/2021

ECOTOSSICOLOGIA

1969: *TRUHAUT* conia il termine **ECOTOSSICOLOGIA** per definire

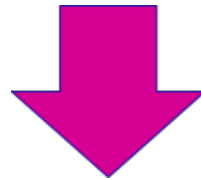
«la branca della tossicologia che si interessa degli effetti dannosi delle sostanze chimiche indotti negli ecosistemi»
(**ECOLOGIA** + **TOSSICOLOGIA**).

Considera quindi le azioni sui singoli individui, ma anche sulle popolazioni e sulle biocenosi (comunità delle specie di un ecosistema che vive in un determinato ambiente).

ECOTOSSICOLOGIA

NEWMAN (1998):

scienza dei contaminanti nella biosfera ed i loro effetti sui costituenti della biosfera (uomo incluso).



SCIENZA CHE DEFINISCE GLI EFFETTI DELLE SOSTANZE TOSSICHE SUGLI ECOSISTEMI CON LO SCOPO DI PROTEGGERE L'INTERO ECOSISTEMA, E NON SOLO COMPONENTI ISOLATI.

MONITORAGGIO VS ECOTOSSICOLOGIA

La ricerca di residui nei tessuti di piante ed animali **NON** può essere considerata come ECOTOSSICOLOGIA, ma come «semplice» opera di monitoraggio.

L'ecotossicologia cerca di valutare gli **EFFETTI** che questi livelli di residui hanno sull'organismo, le popolazioni o le comunità.

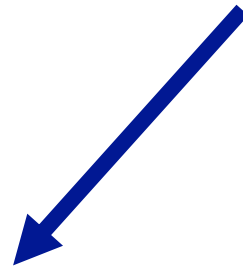
MONITORAGGIO → SCIENZA DEL «MORTO»

ECOTOSSICOLOGIA → SCIENZA DEL «VIVO»

*CAPACITÀ DI UNA SOSTANZA DI CAUSARE
UN DANNO AD UN ORGANISMO VIVENTE*

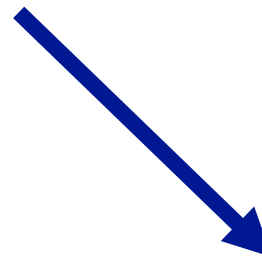


TOSSICITÀ



DIRETTA

Il composto agisce
direttamente sul sito
d'azione e l'organismo



INDIRETTA

Il composto agisce
modificando l'ambiente
di vita degli organismi

- Proprietà del tossico
- Meccanismo d'azione
- Capacità di metabolizzazione

IMMEDIATA

RITARDATA

TOSSICITÀ

```
graph TD; T[TOSSICITÀ] --> I[IMMEDIATA]; T --> R[RITARDATA]; T --> RE[REVERSIBILE]; T --> IR[IRREVERSIBILE]; RE --- RE_desc[Intervengono meccanismi di riparazione]; IR --- IR_desc[Non si ha riparazione];
```

REVERSIBILE

Intervengono
meccanismi di
riparazione

IRREVERSIBILE

Non si ha riparazione

ECOTOSSICITÀ

- Esiste una relazione causa-effetto
- Esiste una relazione dose-risposta
- L'effetto può essere quantificato

TOSSICOLOGIA

La **TOSSICOLOGIA** è stata storicamente lo “studio dei veleni”
Nell’accezione moderna è la scienza che si occupa di studiare:

- ❖ I tipi di effetto generati dalle sostanze chimiche
- ❖ I processi biochimici e fisiologici responsabili degli effetti osservati
- ❖ La sensibilità di differenti tipi di organismi all’esposizione ad agenti chimici (e fisici)
- ❖ La tossicità relativa di differenti sostanze e categorie di sostanze

TOSSICOLOGIA AMBIENTALE

Nel dominio della tossicologia rientrano sia la tossicologia ambientale che l'ecotossicologia.

Secondo Chapman (2002):

- La **TOSSICOLOGIA AMBIENTALE** si occupa sostanzialmente dello studio degli effetti tossici sul biota, principalmente attraverso esperimenti di laboratorio su singole specie indicatrici.
- L'**ECOTOSSICOLOGIA** si occupa dello studio degli effetti tossici sulle comunità naturali; nasce dall'integrazione dell'ecologia nella tossicologia.

TOSSICOLOGIA AMBIENTALE

Tossicologia ambientale	Ecotossicologia
Priorità alle esigenze di laboratorio (campionamento, allevamento, mantenimento, test)	Precedenza a esigenze ecologiche (rete trofica, struttura della comunità)
Test su singola specie	Test su più specie
Attenzione focalizzata sui costi dei test	Attenzione focalizzata sui costi derivanti da una decisione sbagliata
Procedure semplici	Procedure complesse
Interesse focalizzato sulla sostanza da testare	La sostanza da testare è solo uno degli aspetti da considerare
Coinvolgi solo tossicologi	Coinvolge ecologi e tossicologi

ECOTOSSICOLOGIA (EVOLUZIONE)

Ecologia:

Interazione tra gli organismi
Studio delle popolazioni
Processi ecosistemici

Osservazioni
di campo

Osservazioni di
campo pianificate

Manipolazioni
sperimentali

Progresso nel tempo

Ecotossicologia
Ecologia in presenza
delle sostanze tossiche

Tossicologia ambientale:

Effetti delle sostanze tossiche
sul biota

Test di laboratorio
su singola specie

Impiego di micro-
e mesocosmi

Esperimenti
complessi *in situ*

RADICI STORICHE DELL'ECOTOSSICOLOGIA

La nascita dell'ecotossicologia a fine anni '60 non è un evento casuale, ma la diretta conseguenza di cambiamenti nella percezione dell'inquinamento e dei suoi effetti.

A partire dagli anni '50, il “*paradigma della diluizione*”, che confidava nella “capacità detossificante dell'ambiente” sfruttando processi di diluizione fino al raggiungimento di concentrazioni di “non effetto” per gli organismi, è stato lentamente sostituito dal “*paradigma del boomerang*”, che prevede che tutto ciò che viene gettato in ambiente può “ritornare” e danneggiarci

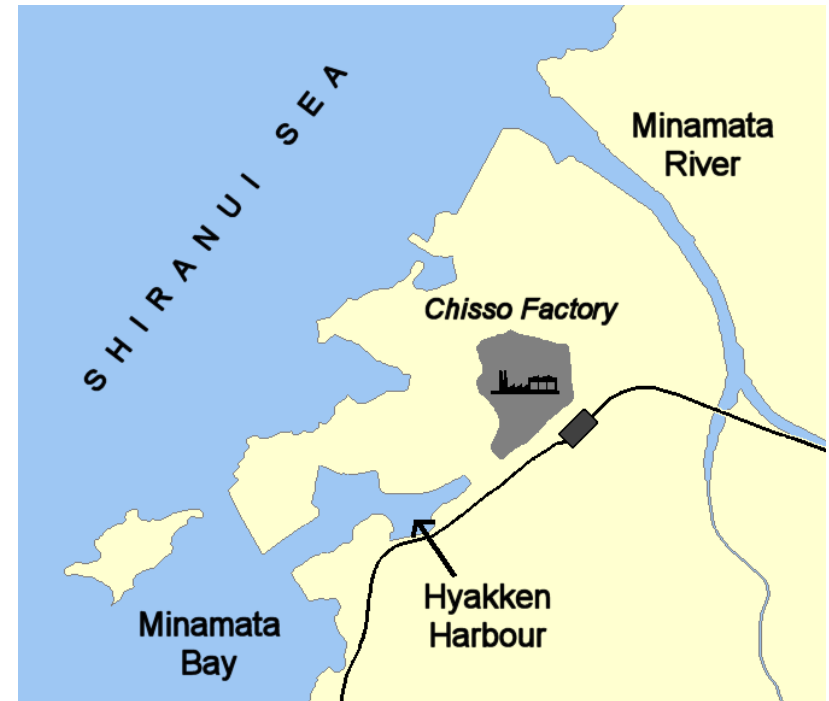
LA “SINDROME DI MINAMATA”

Primi casi di “*epidemia di disturbi nervosi di origine sconosciuta*” nel 1956 nella prefettura di Minamata:

- ✓ progressiva perdita della coordinazione motoria (atassia)
- ✓ alterazione della sensibilità degli arti (parestesia)
- ✓ convulsioni

Osservazione dell’aumento locale della frequenza di fenomeni anomali su animali:

- convulsioni, comportamenti anomali e moria di gatti
- corvi che non riuscivano a volare e cadevano
- morie di pesci



Tutti i “soggetti” colpiti hanno una dieta a base di pesce e molluschi
I ricercatori ipotizzano un avvelenamento da metalli (Mn o Hg)
Si sospettano gli scarichi dell’impianto chimico della Chisso Corporation

LA “SINDROME DI MINAMATA”

La produzione di acetaldeide nell’impianto della Chisso Corp. prevedeva l’uso di HgSO_4 (solfato di Mercurio) come catalizzatore, ma una reazione collaterale nel ciclo di catalisi portava alla produzione di *metil-Hg*

Il metil-Hg è stato sversato nelle acque della baia di Minamata con le acque reflue dal 1951 al 1968

Da acque e sedimenti è entrato nella catena trofica acquatica (*biomagnificazione*) fino a raggiungere la popolazione umana che si nutriva prevalentemente di pesce (sushi)

Le “vittime” stimate sono circa 2.200, di cui oltre 1.000 decessi

LA “SINDROME ITAI-ITAI”

Sindrome apparsa a partire dal 1912 nella prefettura di Toyama, (Giappone), associata a indebolimento delle ossa, forti dolori articolari e alla spina dorsale e blocco renale.

La sindrome è stata generata da *avvelenamento da Cd.*

L'avvelenamento è stato causato da fanghi minerari ricchi di metalli (tra cui Cd) rilasciati nelle acque del fiume Jinzu, utilizzate per la pesca e per l'irrigazione delle risaie.

L'esposizione della popolazione è quindi avvenuta, come nel caso di Minamata, attraverso l'assimilazione del cibo.



L'INQUINAMENTO RADIOATTIVO

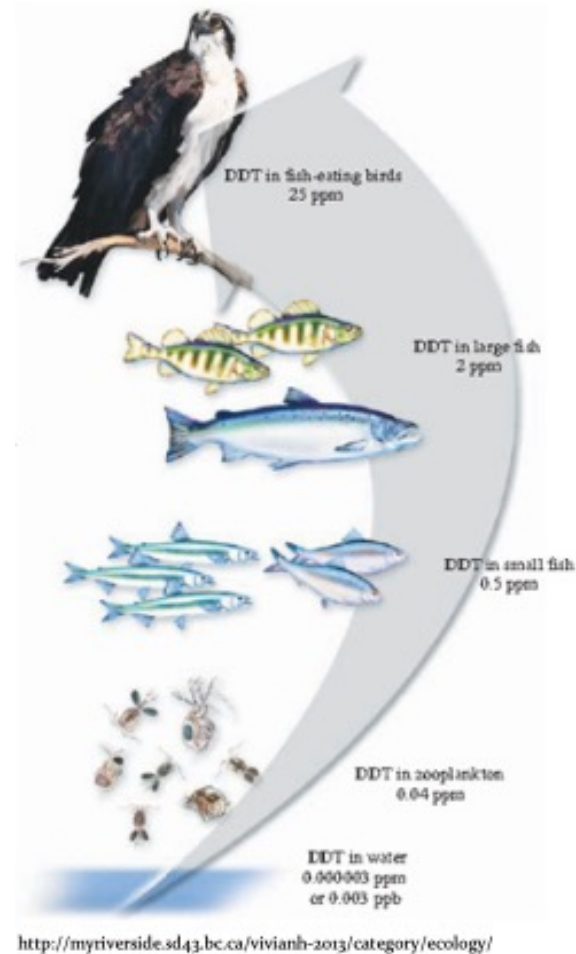
1945 - inizio dei test nucleari ad Alamogordo (New Mexico) e sganciamento delle bombe atomiche su Hiroshima e Nagasaki prime osservazioni sugli effetti del fallout radioattivo

1954 - esplosione della bomba H nell'atollo di Bikini, si assiste alla rapida dispersione emisferica dei prodotti di fissione e all'inatteso accumulo degli stessi in prodotti destinati al consumo alimentare aumenta la preoccupazione per le conseguenze sulla salute umana dei ripetuti esperimenti

PESTICIDI ORGANOCLOORURATI

Il caso più emblematico è stato l'uso a larga scala del pesticida **DDT**, i cui effetti furono documentati nel libro *Silent Spring* (1962) di Rachel Carson.

Il **DDT** e il suo metabolita **DDE**, si accumulano nei lipidi ed entrano nella **rete trofica** degli ambienti acquatici, producendo effetti tossici diretti e indiretti fino all'apice della catena trofica (danni cerebrali o effetti a livello riproduttivo in rapaci e uccelli ittiofagi)



PESTICIDI ORGANOCLOORURATI

Uno dei meccanismi implicati è *l'inibizione della Ca-ATPasi* della ghiandola deputata alla creazione del guscio delle uova, che ha generato fenomeni di *egg-shell thinning*.

Dal 1957 al 1960 nel lago Clear in California morirono molti esemplari di *Aechmophorus occidentalis* (svasso cigno)

In UK vennero registrate diminuzioni importanti di popolazioni di *Falco peregrinus* e di altri rapaci

Dal 1969 al 1972 la riproduzione del pellicano *Pelecanus occidentalis* nella costa del South Carolina (USA) diminuì a tal punto da minacciare la specie

L'ECOTOSSICOLOGIA OGGI

“L’ecotossicologia è la scienza dei *contaminanti* presenti nella biosfera e dei loro effetti sulle componenti della biosfera, inclusi gli esseri umani”

Newman (2010)

“Lo studio degli effetti nocivi dei prodotti chimici sugli ecosistemi ed include gli effetti a livello di individuo e i conseguenti effetti a livello di popolazione e superiori”

Walker et al. (2012)

ALCUNE DEFINIZIONI

INQUINANTE: una sostanza che si trova in ambiente come conseguenza (almeno in parte) delle attività antropiche e che genera effetti negativi sugli organismi (Moriarty, 1993)

CONTAMINANTE: una sostanza rilasciata in ambiente da attività antropiche (Moriarty, 1993) (ma può essere anche di origine naturale)

XENOBIOTICO: sostanza o materiale di origine non naturale e comunemente considerato un costituente estraneo rispetto ai sistemi biologici

CONTAMINANTI E INQUINANTI

Secondo alcuni ecotossicologi (Walker et al., 2003), tuttavia, "contaminanti" ed "inquinanti" sono ormai sinonimi, in quanto raramente si può dire che i contaminanti non abbiano la potenzialità di causare danni ambientali, viste le consistenti e crescenti quantità di elementi e molecole rilasciate in ambiente da produzioni industriali, attività agricole e comparti abitativi.

POSIZIONE CONTROVERSA, è preferibile mantenere la distinzione tra i due termini come da “tradizione” ecotossicologica

LA MULTIDISCIPLINARIETÀ

L'ecotossicologia è una scienza multidisciplinare

Si basa su concetti della tossicologia classica e dell'ecologia abbracciando i campi di:

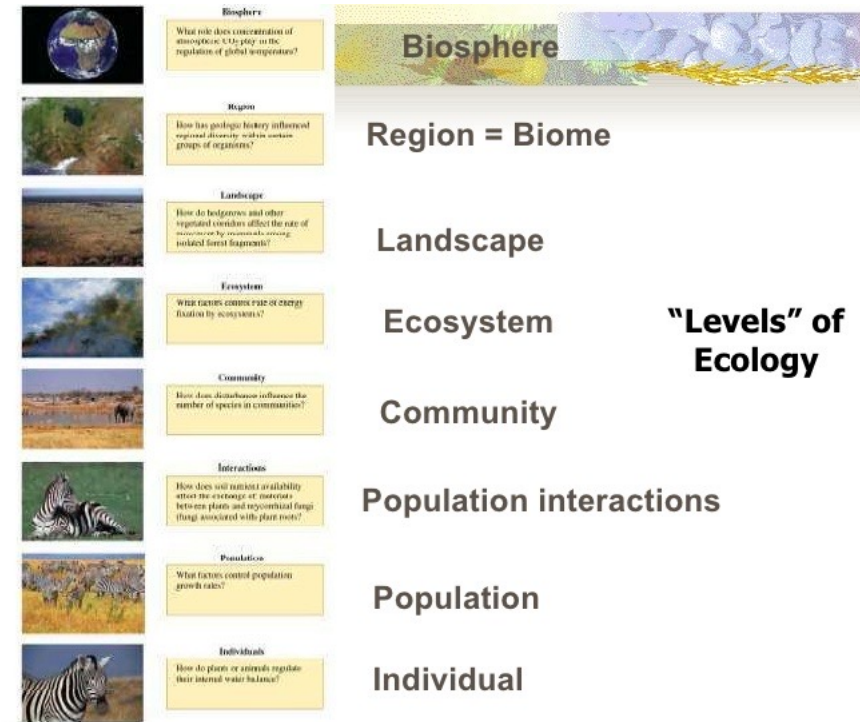
- ✓ chimica (proprietà dei contaminanti)
- ✓ statistica (analisi dei dati)
- ✓ modellistica (modelli di bioaccumulo e trasferimento dei contaminanti)
- ✓ biologia molecolare (biomarker molecolari)

SCALE

SPAZIO-TEMPORALI IMPLICATE

L'ecotossicologia studia gli effetti dei contaminanti a diversi livelli di complessità...
... ma i processi ad un determinato livello hanno origine dai livelli inferiori e mostrano le loro conseguenze ai livelli successivi

Ecosystem Landscape Biosphere



LE SCALE IMPLICATE



si impiegano soprattutto in
approcci di tipo
PROATTIVO e **PREVENTIVO**
(per valutare la possibilità che si
verifichi un effetto, principio di
precauzione)

Si utilizzano principalmente a
fini **DOCUMENTALI** e sono
fondamentali per innescare
provvedimenti di
REGOLAMENTAZIONE

GLI OBIETTIVI

L'ecotossicità è uno dei concetti base dell'ecotossicologia:

“Sostanze a bassa o nulla tossicità a breve termine per una specie possono provocarne comunque la scomparsa in un dato ambiente, direttamente o indirettamente”

Introduce il concetto di effetto a lungo termine e di effetti indiretti, che costituiscono il cardine della *community ecotoxicology*

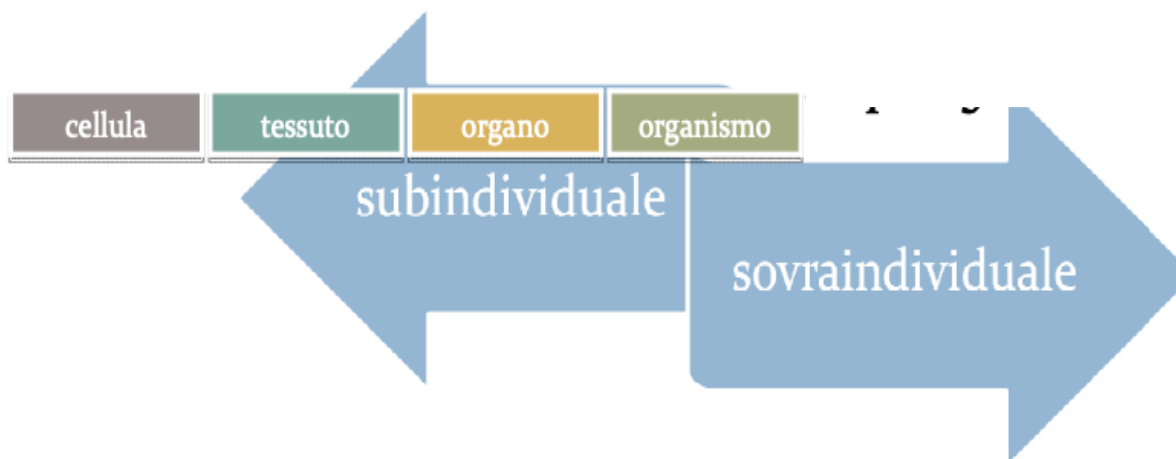


STUDIO DELL'ECOTOSSICITÀ

BIOMARKERS

variazioni biochimiche, cellulari, fisiologiche o comportamentali che possono essere misurate in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo che danno evidenza di esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti

Depledge and Fossi (1994)



STUDIO DELL'ECOTOSSICITÀ

ANALISI DI BIOACCUMULO (O BODY BURDENS)

analisi dei livelli di concentrazione dei contaminanti nell'intero organismo o in specifici organi o tessuti
body burdens: quantità o massa totale di contaminante in un individuo

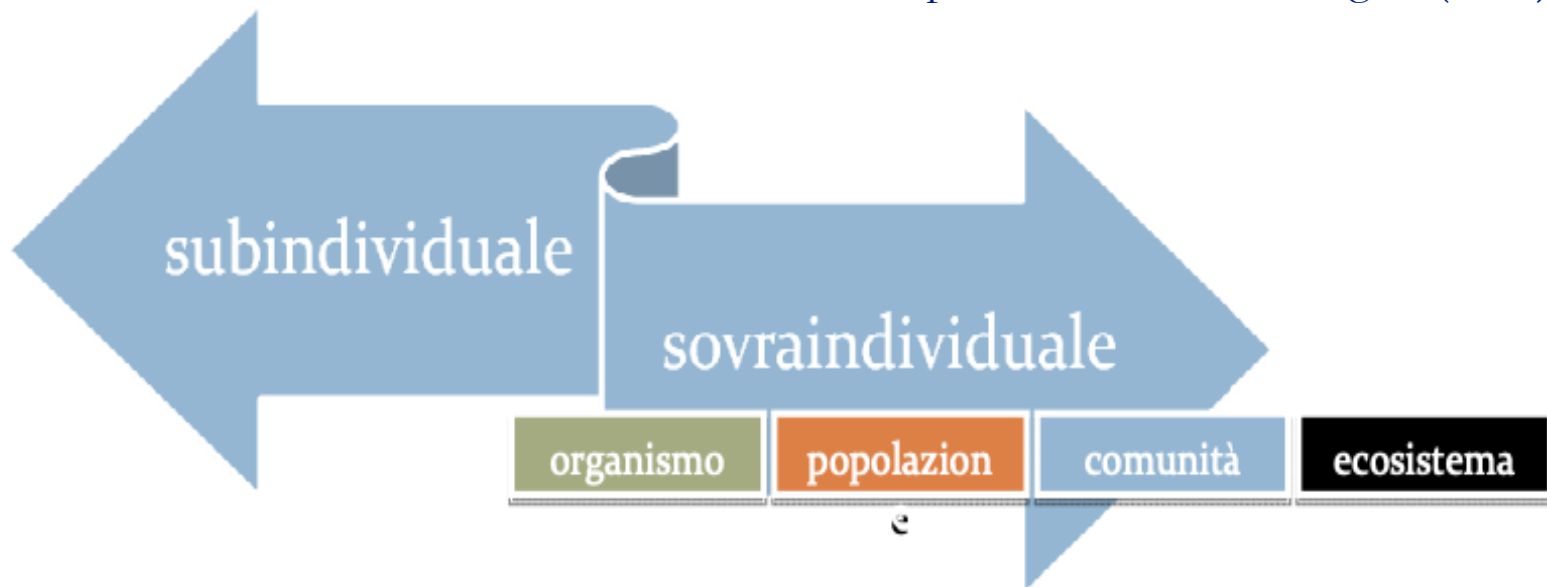


STUDIO DELL'ECOTOSSICITÀ

SAGGI DI TOSSICITÀ

esposizione di organismi indicatori a un campione ambientale contenente una miscela di inquinanti in quantità non note, in condizioni sperimentali controllate

Volpi Ghirardini and Pellegrin (2001)



TEMATICHE ATTUALI PER L'ECOTOSSICOLOGIA

I composti chimici emergenti o non convenzionali (ritardanti di fiamma, fragranze, farmaci, prodotti antimicrobici, creme solari, pesticidi di nuova generazione), che oltre agli effetti tossici “tradizionali” possono agire come “endocrine disrupting chemicals”

➤ Le MICROPLASTICHE

➤ I prodotti a scala nanometrica (NANOMATERIALS)

TEMATICHE ATTUALI PER L'ECOTOSSICOLOGIA

ENDOCRINE DISRUPTERS (EDC)

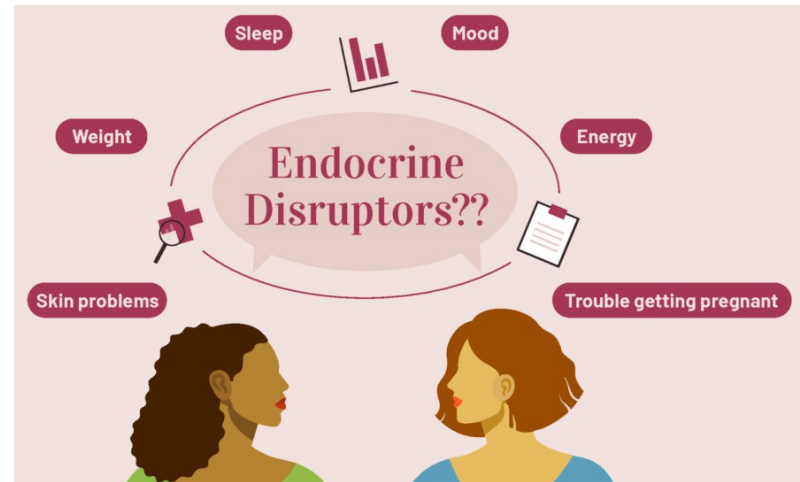
Agenti inquinanti (anche di origine naturale) che interferiscono con la sintesi, il metabolismo, l'azione o l'eliminazione degli ormoni endogeni indispensabili per il mantenimento dell'omeostasi e per la regolazione dei processi di crescita, sviluppo e riproduzione

- ✓ Prodotti farmaceutici
- ✓ Ormoni sintetici
- ✓ Bisfenolo A e ftalati
- ✓ Pesticidi (fenoxycarb)
- ✓ Fragranze e muschi
- ✓ Ritardanti di fiamma (Polibromodifenileteri - PBDE)

TEMATICHE ATTUALI PER L'ECOTOSSICOLOGIA

ENDOCRINE DISRUPTERS (EDC)

- ✓ Presentano molteplici vie di esposizione
- ✓ Esercitano effetti a concentrazioni molto basse
- ✓ I meccanismi di trasporto atmosferico e le correnti marine li rendono ubiquitari
- ✓ Possono biomagnificare lungo la rete trofica



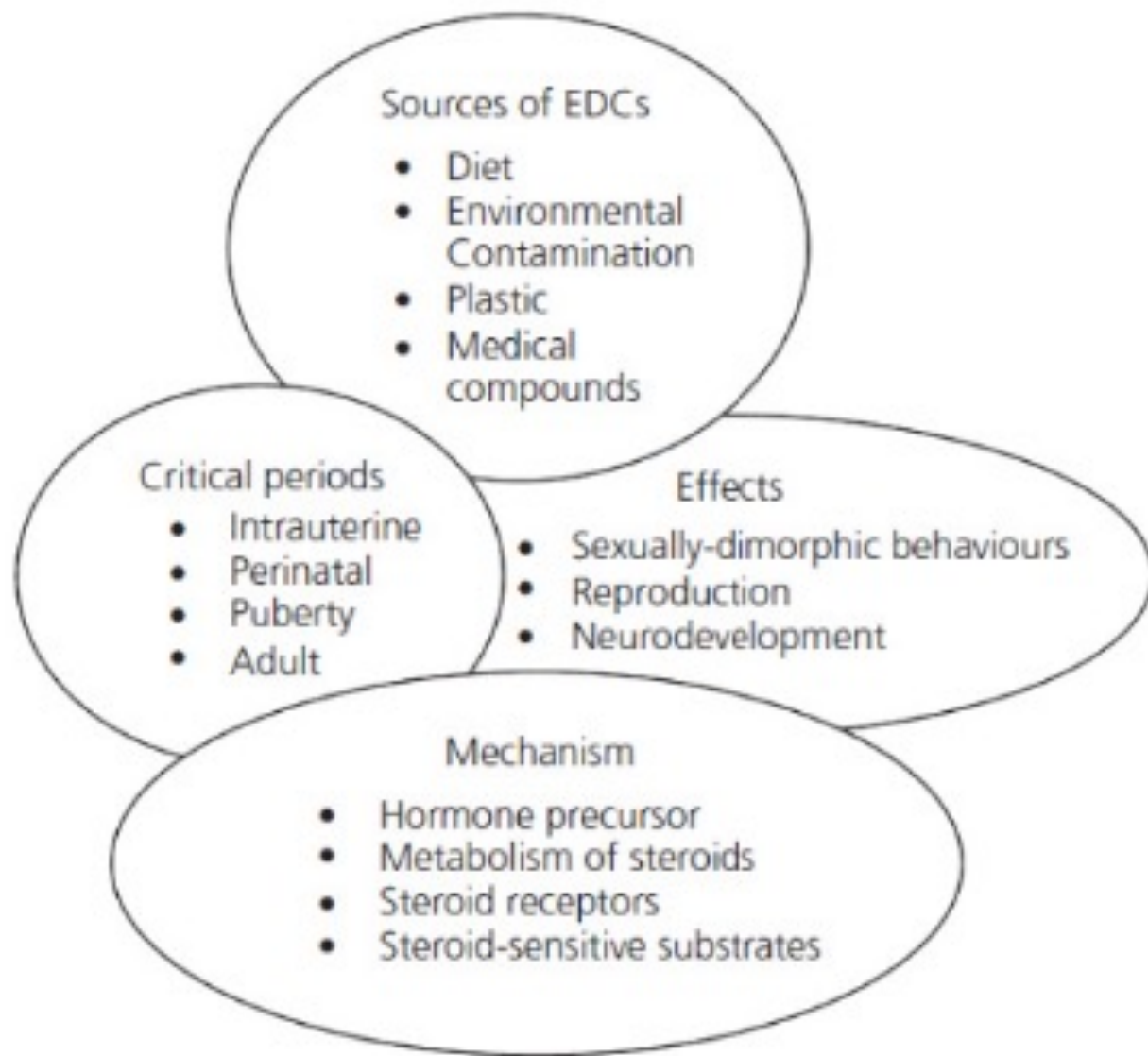
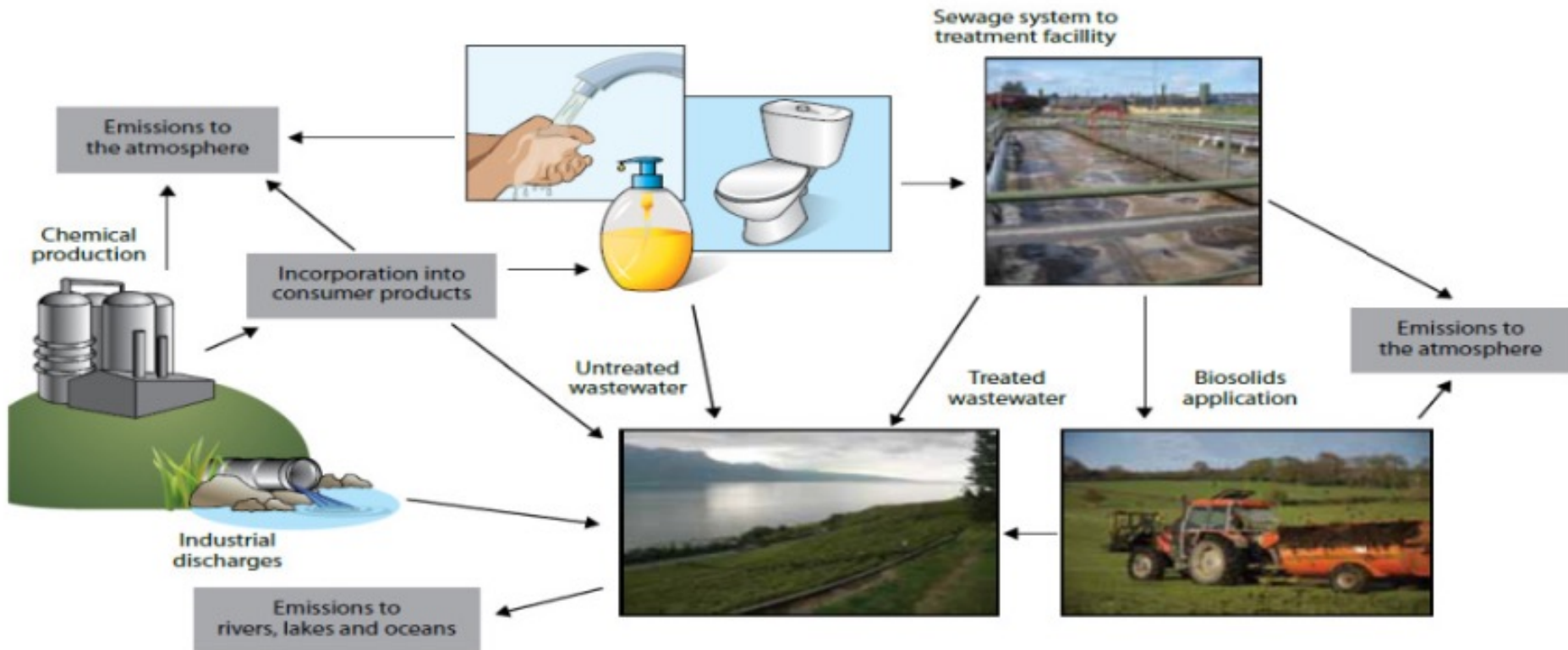


Fig. 1. A schematic representation of varied sources of endocrine disrupting chemicals (EDCs) and how they may influence sexually-dimorphic, reproductive and neurodevelopmental processes, in particular through their actions during critical periods of development. Some of the steroids mechanisms that may mediate the actions of EDCs are included.

TEMATICHE ATTUALI PER L'ECOTOSSICOLOGIA



TEMATICHE ATTUALI PER L'ECOTOSSICOLOGIA

NANOMATERIALI

Sono utilizzati in varie applicazioni industriali e commerciali (i.e. medicinali, prodotti per l'igiene personale)

Sono ormai presenti in aria, acqua, suolo e sedimento per contaminazione diretta e/o indiretta

Rappresentano un rischio perché le loro dimensioni ne consentono l'attraversamento delle barriere cellulari e l'interazione con le strutture subcellulari

Possono agire da veicolo all'interno dell'organismo di altri inquinanti adsorbiti sulla loro superficie

SFIDE FUTURE PER L'ECOTOSSICOLOGIA

CLIMATE CHANGE

L'aumento della CO_2 atmosferica determina un aumento dell'acidità degli oceani.

La ridotta disponibilità di CO_3^{2-} determina una decalcificazione delle strutture calcaree e l'aumento dell'investimento energetico per le larve che devono sviluppare strutture calcaree.

Dissoluzione delle valve, malformazioni larvali, suscettibilità a predazione ed epidemie, mortalità

- foraminiferi
- bivalvi
- gasteropodi
- echinodermi
- celenterati
- Alghe rosse calcaree

SFIDE FUTURE PER L'ECOTOSSICOLOGIA

OCEAN ACIDIFICATION

HOW WILL CHANGES IN OCEAN CHEMISTRY AFFECT MARINE LIFE?

CO₂ absorbed from the atmosphere

The diagram illustrates the process of ocean acidification. At the top, a blue sky transitions into a red ocean surface. Four red arrows point downwards from the sky to the ocean, labeled 'CO₂ absorbed from the atmosphere'. Below the surface, a horizontal axis shows the progression of acidification. On the left, a green, healthy nautilus shell is shown in a circular inset. A yellow arrow points to a yellow, partially dissolved shell in a circular inset. A red arrow points to a red, completely dissolved shell in a circular inset. Below this axis, the chemical reaction is shown: $CO_2 + H_2O + CO_3^{2-} \rightarrow 2 HCO_3^-$. Below the reaction, ball-and-stick models represent the molecules: carbon dioxide (one black carbon atom, two red oxygen atoms), water (one red oxygen atom, two white hydrogen atoms), a carbonate ion (one black carbon atom, three red oxygen atoms), and two bicarbonate ions (one black carbon atom, three red oxygen atoms, one white hydrogen atom). Labels below the models identify them as 'carbon dioxide', 'water', 'carbonate ion', and '2 bicarbonate ions'. At the bottom, the text reads 'consumption of carbonate ions impedes calcification'. On the left side of the diagram, there are illustrations of various marine life, including a green nautilus shell, a white nautilus shell, and several fish.

CO₂ + H₂O + CO₃²⁻ → 2 HCO₃⁻

carbon dioxide water carbonate ion 2 bicarbonate ions

consumption of carbonate ions impedes calcification

SFIDE FUTURE PER L'ECOTOSSICOLOGIA

CLIMATE CHANGE

Il regime delle precipitazioni cambia e con esso la distribuzione dei contaminanti.

I fiumi hanno portate ridotte, quindi c'è minore diluizione degli scarichi e dei carichi derivanti dal dilavamento di suoli, pavimentazioni stradali e terreni agricoli.

Le inondazioni disperdono i sedimenti potenzialmente contaminati distribuendoli su suoli e terreni agricoli.

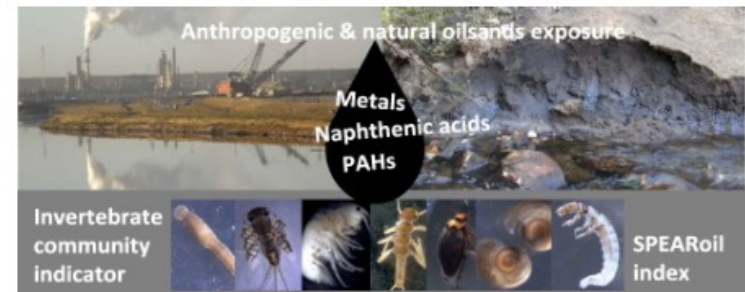
Le specie stressate dal clima instabile diventano maggiormente sensibili allo stress chimico.

SFIDE FUTURE PER L'ECOTOSSICOLOGIA

PEAK OIL

Quando la disponibilità di petrolio comincerà a diminuire, gli sforzi saranno indirizzati sulle sabbie bituminose.

La sfida consisterà nello studio degli effetti generati dai “prodotti collaterali” dei tentativi di convertire le sabbie bituminose in carburante.



SFIDE FUTURE PER L'ECOTOSSICOLOGIA

ECOLOGICAL OVERSHOOT

L'umanità consuma risorse più velocemente di quanto queste si stiano rigenerando

La soluzione percorribile a breve termine è il ripristino degli ecosistemi danneggiati

L'ecotossicologia giocherà un ruolo chiave per identificare quali ecosistemi siano idonei per la ricolonizzazione e quali “usi” siano possibili negli ecosistemi riconvertiti, al fine di evitare fenomeni di bioaccumulo/biomagnificazione

SVILUPPI FUTURI PER L'ECOTOSSICOLOGIA

- **Aumentare il contributo dell'ecologia nell'ecotossicologia**

l'ecotossicologia è ancora più legata ad un approccio di tipo “tossicologico” rispetto ad un approccio di tipo “ecologico”

- **Superare le “barriere” del laboratorio e delle relazioni dose-effetto**

gli studi ecotossicologici si basano più su indagini di laboratorio, che mirano a stabilire una relazione dose-effetto, rispetto ad indagini in situ o sugli effetti a lungo termine dell'esposizione ai contaminanti

- **Aumentare la capacità predittiva ai livelli gerarchici superiori**

lo studio degli effetti copre principalmente i livelli più bassi della scala gerarchica, dalla biochimica al singolo individuo, mentre esplora solo raramente i livelli di popolazione, comunità ed ecosistema

TOSSICITÀ ED ECOTOSSICITÀ

Alterazione dello stato normale in seguito a contatto (assorbimento) di una sostanza chimica.

- ✓ *Acuta* – strettamente correlata alla sostanza, alla dose al tempo e alla specie (ambiente)
- ✓ *Cronica e subcronica* – non necessariamente correlata alla dose, al tempo e alla specie (ambiente)
- **Problemi all'animale** (Tossicità ed **ecotossicità**)
(patologie connesse alla presenza di concentrazioni di contaminati o di inquinanti tossiche)
- **Animale produttore di derrate**
(superamento di eventuali LMR - limiti massimi residui - e non commercializzazione)

CONCETTO DI INDICATORE BIOLOGICO

Qualsiasi organismo in grado di fornire informazioni sulla qualità dell'ambiente e sui suoi cambiamenti.

Ecosistemi equilibrati presentano moltissime specie con pochi individui. Un ecosistema perturbato presenta invece una riduzione o la scomparsa delle specie sensibili, con proliferazione di quelle più resistenti agli inquinanti.

Alcuni esempi:

- ❖ carnivori predatori nelle catene alimentari terrestri e acquatiche
- ❖ api (soprattutto per inquinamento chimico da metalli pesanti e da antiparassitari)
- ❖ macroinvertebrati nelle acque dolci

BIOMONITORAGGIO

Con il termine di **BIOMONITORAGGIO** si intende il monitoraggio dell'inquinamento mediante organismi viventi.

Le principali tecniche di biomonitoraggio consistono nell'uso di organismi:

BIOACCUMULATORI: organismi in grado di sopravvivere in presenza di inquinanti che accumulano nei loro tessuti.

BIOINDICATORI: organismi che subiscono variazioni evidenti nella fisiologia, nella morfologia o nella distribuzione spaziale sotto l'influsso delle sostanze presenti nell'ambiente.

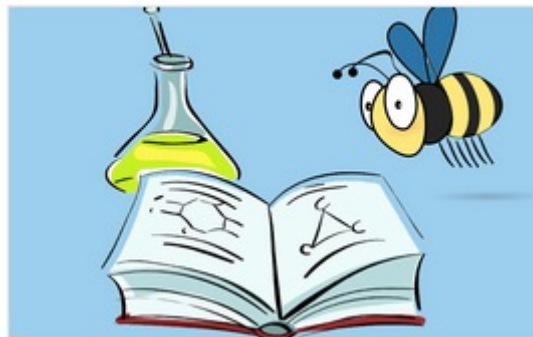
Il biomonitoraggio, rispetto alle tecniche analitiche tradizionali, ha il vantaggio di fornire stime degli effetti inquinanti sugli esseri viventi.

BIOINDICATORI

Come si manifestano gli effetti del cambiamento ambientale sugli organismi?

Attraverso:

reazioni identificabili di tipo ecologico, comportamentale, biochimico, fisiologico, morfologico (bioindicatori propriamente detti) con capacità di accumulare dai diversi comparti ambientali (aria, acqua, suolo) quantità misurabili di contaminanti (bioaccumulatori e biomonitors)



CARATTERISTICHE NECESSARIE

- optimum ecologico ed ampia distribuzione nell'area di studio
- facile identificazione sistematica
- buone conoscenze su anatomia, fisiologia ed ecologia della specie
- uniformità genetica e lungo ciclo vitale (ma in casi particolari si usano anche microrganismi)
- facile reperibilità in tutte le stagioni (ma in casi particolari si usano anche organismi a ciclo stagionale)
- scarsa mobilità (stanzialità), ad eccezione dei bioindicatori su scala globale

...ed ancora

- ✓ il ruolo ecologico che lo predispone all'impatto con i contaminanti
- ✓ le risposte che è in grado di fornire

DISTRIBUZIONE AMBIENTALE

Le sostanze chimiche introdotte nell'ambiente per specifici scopi ed in varie maniere si muoveranno dal punto di entrata (fase ambientale: aria, acqua, suolo) verso la loro destinazione finale, ossia **il comparto ambientale per il quale hanno la maggiore affinità.**

Tale comparto può bloccare o semplicemente fungere da serbatoio cosicché le sostanze chimiche possono essere trasferite nuovamente verso altri comparti. In esso vanno incontro a **trasformazioni.**

DISTRIBUZIONE AMBIENTALE

Processi a cui può andare incontro una molecola di inquinante

- **Volatilizzazione**
- **Trasporto:**
 - lisciviazione, dilavamento, trasporto via corrente
- **Immobilizzazione:**
 - **Assorbimento** avviene principalmente nel biota
 - **Adsorbimento** avviene principalmente sulle superfici di particolato sospeso, sedimenti e suolo.
 - **A differenza delle molecole assorbite, le molecole adsorbite possono ancora essere degradate.**
- **Degradazione:**
 - **Chimica:** idrolisi, ossidazione and riduzione
 - **Fisica:** fotolisi, dissociazione e ionizzazione
 - **Biologica:** biodegradazione, metabolizzazione

DISTRIBUZIONE AMBIENTALE

Le proprietà chimico-fisiche degli inquinanti e le caratteristiche del comparto abiotico determinano quanto tempo ed in che forma una sostanza si troverà o si muoverà da/per un dato comparto.

- **Persistenza:** è il tempo di permanenza di un inquinante in un determinato comparto, qualunque sia la via cui questo viene rimosso (degradazione, trasporto di massa, assorbimento).
- **Resistenza alla degradazione:** capacità di una sostanza di rimanere in forma inalterata nell'ambiente. È rappresentata dal tempo di dimezzamento (halphlife).

DISTRIBUZIONE AMBIENTALE

BIODEGRADAZIONE

Detossificazione

La biodegradazione primaria dovrebbe portare direttamente a composti meno tossici di quelli iniziali. La biodegradazione primaria può portare a prodotti più tossici, ma meno stabili e più facilmente degradabili.

Principali biotrasformazioni che avvengono nelle biodegradazioni: OSSIDAZIONI, RIDUZIONI, IDROLISI.

Con queste reazioni lo xenobiotico viene trasformato in composti strutturalmente più simili ai composti usualmente metabolizzati dal microorganismo, il quale poi li degrada nel suo normale ciclo metabolico.

DISTRIBUZIONE AMBIENTALE

- **La prima fase nell'analisi del rischio**
 - l'identificazione del pericolo delle sostanze chimiche (*hazard identification*) ed il loro potenziale destino nell'ambiente.
- **diviene importante conoscere**
 - le proprietà fisiche, chimiche, di bioaccumulo e tossicologiche delle sostanze in esame
- **per valutare il rischio della loro presenza nell'ambiente**

DISTRIBUZIONE AMBIENTALE

Trasporto e Destino in ambienti acquatici

- Biodegradazione
- Fotodegradazione
- Bioaccumulo in organismi acquatici
- Volatilizzazione
- Adsorbimento su solidi sospesi e sedimenti

PERICOLOSITÀ E DESTINO AMBIENTALE SOSTANZE CHIMICHE

SOLUBILITÀ

- è uno dei più importanti fattori che determinano il trasporto degli inquinanti. Rappresenta la capacità di una sostanza di sciogliersi in acqua
 - viene indicata dal rapporto tra la quantità soluto ed il volume del solvente, nella pratica ambientale rappresentato dall'acqua.
- è un parametro caratteristico della sostanza
 - che varia al variare delle condizioni di temperatura e di pressione e viene generalmente espresso in mg/l o in moli/l.

PERICOLOSITÀ E DESTINO AMBIENTALE SOSTANZE CHIMICHE

SOLUBILITÀ

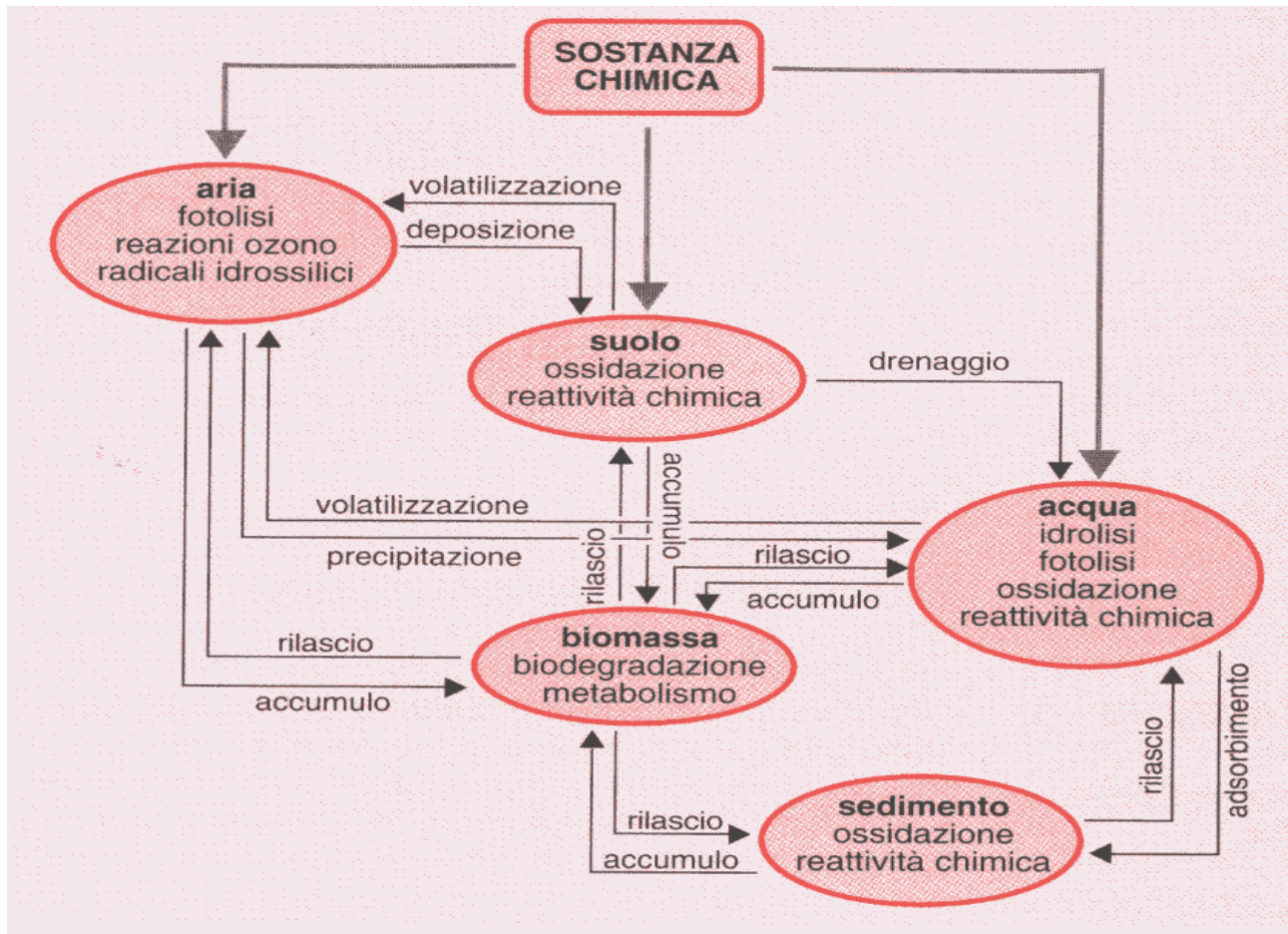
- **Sostanze ioniche e polari**
 - si dissolvono in acqua
- **Sostanze non-polari o debolmente polari**
 - si dissociano in acqua in percentuali molto basse.
- **Sostanze ambientalmente pericolose** come diossine, PCBs ed alcuni pesticidi organici clorurati,
 - sono debolmente disciolti in acqua.

PERICOLOSITÀ E DESTINO AMBIENTALE SOSTANZE CHIMICHE

PARAMETRI DI BIOACCUMULO

- La modellizzazione del processo di bioaccumulo è molto complessa perché tiene conto di diversi fenomeni:
- Uptake
 - è il fenomeno che indica il movimento del contaminante all'interno dell'organismo e può interessare le branchie, l'intestino, l'epidermide la superficie polmonare, le radici, le foglie etc.
- **Biotrasformazione**
 - all'interno dell'organismo la sostanza chimica può essere trasformata.
- **Eliminazione**
 - è l'escrezione del contaminante dall'organismo. I processi di eliminazione variano molto tra piante, invertebrati, vertebrati e a seconda della sostanza.
- **La biotrasformazione e l'eliminazione** sono due processi che indicano un abbassamento della concentrazione di contaminante all'interno dell'organismo.

MECCANISMI DI TRASPORTO NEI DIVERSI COMPARTI AMBIENTALI



STUDI di TOSSICITÀ SPERIMENTALE

SOSTANZA



Studi di tossicità
sperimentale

Studi epidemiologici
Farmacovigilanza

Relazione
struttura-attività

Studi di ecotossicologia

Caratteristiche fisiche
e chimiche

IDENTIFICAZIONE E VALUTAZIONE DELLA PERICOLOSITA'



Tossica



Simile a carcinogeni
noti



Persistente nell'ambiente
Tossico per vita acquatica



Esplosiva
Infiammabile

**STIMA
DELL'ESPOSIZIONE**



VALUTAZIONE DEL RISCHIO¹ ANALISI RISCHIO/BENEFICIO



¹ Il concetto di Rischio è diverso da quello di pericolosità.

FARMACI (SPECIALITA' MEDICINALI)

1) Studi pre-registrativi

- Per l'autorizzazione all'immissione in commercio (registrazione) sono richiesti studi tossicologici sperimentali.
- Il tipo di studi da effettuare e le modalità con cui vanno eseguiti sono definiti da apposite Linee Guida, in base alle modalità di utilizzo previste (durata, via di somministrazione, popolazione trattata) ed alla natura del farmaco (attività farmacologica, struttura chimica).
- Negli studi clinici pre-registrativi (fase I-III) si possono identificare gli effetti tossici più frequenti.

2) Studi post-marketing

Dopo l'immissione in commercio la tossicità nell'uomo nell'intera popolazione trattata e nelle condizioni di utilizzo reale viene monitorata tramite la **farmacovigilanza**.

La valutazione del rischio associato ad una sostanza, e le relative decisioni normative, dipendono da:

- quantità e qualità degli studi effettuati
- approccio all'interpretazione e valutazione dei dati degli studi; dipende da fattori socio-culturali ed economici.

STUDI TOSSICOLOGICI

Sperimentali. Si somministra la sostanza con **precise modalità** (dose, tempo, via ecc.) e se ne studiano gli effetti tossici. Si effettuano su animali, colture cellulari, microrganismi.

Epidemiologici. Si studiano gli effetti di una sostanza su popolazioni umane che sono comunque esposte alla sostanza, presente nell'ambiente o somministrata a scopo terapeutico (farmaci, vaccini).

- **Intossicazione umana accidentale.** Deve essere possibile attribuire con certezza gli effetti osservati all'esposizione (imputabilità)

STUDI SPERIMENTALI VS STUDI EPIDEMIOLOGICI

Studi sperimentali. L'esposizione alla sostanza è strettamente controllata. L'esposizione ad altre sostanze è eliminata o comunque controllata (gruppi di controllo).

Studi epidemiologici. L'esposizione non può essere controllata (tranne che per i farmaci). Gli individui sono contemporaneamente esposti a molte altre sostanze o condizioni che possono influenzare l'effetto tossico.

STUDI TOSSICOLOGICI SPERIMENTALI

- Studi descrittivi. Osservazione e descrizione degli effetti tossici di una sostanza in **animali**, tessuti, cellule isolate, batteri. Servono per caratterizzare la tossicità di una sostanza (dose tossica, organi bersaglio ecc.), soprattutto al fine della stima del rischio. Sono necessari per ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio.

- Studi meccanicistici. Sono gli studi che cercano di chiarire il **meccanismo** con cui una sostanza produce un effetto tossico (es. inibizione enzimatica, agonismo recettoriale, formazioni di composti elettrofili ecc.). Non sono richiesti ai fini regolatori ma possono essere utili per stabilire se un effetto tossico osservato nell'animale si manifesterà o meno anche nell'uomo (es. pesticidi organofosforici, saccarina). Utili anche per il *drug design* di antidoti (es. pralidossima) o sostanze alternative più sicure.
- Studi teorici: relazione struttura-attività. Sono studi volti ad identificare, all'interno di una serie di molecole, i gruppi responsabili dell'effetto tossico. Per alcune classi di composti, sono molto utili per **prevedere** la tossicità di una molecola.

STUDI DESCRITTIVI STUDI ANIMALI

- Lo scopo è definire il **profilo tossicologico** ⇒ valutazione del **rischio nell'uomo**.
- Storicamente, questi studi si sono evoluti in modo empirico.
- Accumulo di informazioni + progressi teorici in campo bio-farmacologico-tossicologico ⇒ elaborazione di **principi teorici**.

PRINCIPI DEGLI STUDI TOSSICOLOGICI

Gli effetti di una sostanza, osservati negli animali in opportune condizioni, possono verificarsi anche nell'uomo.

- ✓ Cellule o tessuti di specie diverse, con funzioni e/o vie biochimiche simili hanno simile suscettibilità tossicologica, poiché posseggono lo stesso 'recettore' (recettori di membrana e intracellulari, canali ionici, pompe e trasportatori, enzimi, DNA ecc.)
- ✓ Differenze di tossicità tra specie simili (**mammiferi**) sono molto spesso dovuti a differenze nel metabolismo (attivazione/inattivazione) della sostanza.

PRINCIPI DEGLI STUDI TOSSICOLOGICI

Gli animali più spesso utilizzati per gli studi di tossicità generale sono ratto e cane, nei quali il metabolismo è più simile a quello umano.

Per alcuni test di tossicità specifica (riproduttiva, tossicità locale) si usano altre specie di mammiferi, particolarmente sensibili a quel tipo di tossicità.

PRINCIPI DEGLI STUDI TOSSICOLOGICI

Specie animali non mammifere (batteri, dafnia, echinodermi, drosofila, pesci) sono eticamente più accettabili ed economicamente più vantaggiose.

Tuttavia, a causa delle enormi differenze farmacocinetiche, i dati ottenuti con queste specie non possono essere estrapolati all'uomo.

Gli studi con queste specie possono però 'allertare' sul potenziale tossico di una sostanza ⇒ necessità di ulteriori studi.

PRINCIPI DEGLI STUDI TOSSICOLOGICI

Per identificare con sicurezza gli effetti tossici di una sostanza negli animali da laboratorio è necessario somministrare alte dosi.

L'uso di alte dosi è dovuto all'inevitabile limitatezza del numero di animali su cui si effettuano i test.

La risposta ad una data sostanza dipende infatti da:

- 1) dose somministrata;
- 2) sensibilità individuale.

ESEMPIO

Supponiamo che **ad una data dose** risponda lo 0,1% di individui (più sensibili). Se l'esperimento viene condotto con 100 animali, la risposta non viene rilevata.

Per essere ragionevolmente sicuri di osservare la risposta **con quella dose**, l'esperimento dovrebbe essere condotto con almeno 5.000 animali.

Aumentando la dose, risponderà una percentuale maggiore di individui (anche quelli meno sensibili).

L'uso di dosi 'elevate' (rispetto a quelle previste nell'uomo) consente quindi di osservare una risposta con un numero 'ragionevole' di animali.

PRINCIPI DEGLI STUDI TOSSICOLOGICI

L'estrapolazione ai livelli di esposizione nell'uomo (in genere molto più bassi) può tuttavia essere problematica (soprattutto cancerogenesi).

Tossicità e sicurezza

Con gli studi descrittivi si cerca di individuare **l'intervallo di dosi tossiche**. È possibile determinare l'intervallo di dosi presumibilmente "sicuro" nell'uomo?

- ✓ Esiste, per ogni sostanza una dose (concentrazione) soglia al di sotto della quale non si hanno effetti sui sistemi biologici?
- ✓ Estrapolazione animale → uomo: differenze metaboliche; minore variabilità interindividuale negli animali da laboratorio.
- ✓ Estrapolazione a basse dosi: qual è la forma della curva estrapolata? (cancerogenesi)

In generale, gli studi di tossicità non sono concepiti per dimostrare che una sostanza è sicura, ma per **caratterizzarne gli effetti tossici** e consentire quindi una valutazione del rischio nell'uomo, che dipende anche da molti altri fattori (esposizione, caratteristiche della popolazione esposta ecc.).

N.B: il rischio è un concetto probabilistico: frequenza attesa di effetti.

OBIETTIVI DEGLI STUDI TOSSICOLOGICI ANIMALI

Natura degli effetti tossici

Relazione dose-effetto (*range* di tossicità, ipersensibilità)

Fattori influenzanti la tossicità (specie, ceppo, sesso, età, modalità di somministrazione ecc.)



Valutazione del rischio

NATURA DELL'EFFETTO TOSSICO

Organi bersaglio.

La tossicità a carico di un organo dipende dalla capacità rigenerativa dell'organo, dalla sua dipendenza dal mantenimento dell'omeostasi, da fattori tossicocinetici (sito di assorbimento, metabolismo, accumulo, eliminazione).

Gli organi più frequentemente colpiti sono: SNC, sistema ematopoietico, fegato, rene, polmone, cute.

NATURA DELL'EFFETTO

Comparsa dell'effetto.

Tossicità immediata (citotossicità, tossicità funzionale).

Tossicità ritardata (genotossicità, tossicità funzionale).

Reversibilità dell'effetto.

Dipende dal tipo di tossicità e dall'organo bersaglio.

Relazione dose-effetto. Curve dose-risposta

Forma della curva. Iper-reattività. Pendenza della curva.

Dose efficace 50 (DE50). È la dose con la quale si ha:

- una risposta pari al 50% dell'effetto massimo
- una risposta nel 50% dei soggetti

Dose soglia. È la dose al di sotto della quale non si manifesta tossicità.

Dipende dal tipo di tossicità in esame.

È la base per estrapolare i limiti di sicurezza.

DE50 e dose soglia sono una misura della potenza di un tossico.

Fattori influenzanti la tossicità

Specie animale

Ceppo

FATTORI INFLUENZANTI LA TOSSICITÀ

Modalità di somministrazione

La tossicità di una sostanza è funzione di:

I. DOSE x ESPOSIZIONE

II. Via di esposizione

III. Durata

IV. Frequenza

FATTORI INFLUENZANTI LA TOSSICITÀ

Via di esposizione

La **tossicità** di una sostanza **dipende dalla via di somministrazione.**

L'ordine di tossicità è: endovenosa, inalatoria, intraperitoneale, sottocutanea, intramuscolare, orale, cutanea.

Negli studi di tossicità acuta si utilizzano due vie (farmaci), di cui una è quella prevista nell'uomo.

Negli studi di tossicità prolungata e cronica si usa quasi sempre la via orale.

FATTORI INFLUENZANTI LA TOSSICITÀ

Durata e frequenza dell'esposizione

La tossicità di una determinata dose aumenta all'aumentare della **durata e della frequenza dell'esposizione**, a causa di due fenomeni:

- accumulo del tossico nell'organismo; si ha quando la velocità di somministrazione (frequenza) è maggiore della velocità di eliminazione e la durata è tale che il tossico raggiunge livelli dannosi.
- accumulo del danno; la velocità di somministrazione (frequenza) è maggiore della velocità di riparazione del danno da parte dell'organismo.

FATTORI INFLUENZANTI LA TOSSICITÀ

- ✓ Se la frequenza di somministrazione è tale che la velocità di somministrazione è maggiore della velocità di eliminazione \Rightarrow accumulo del tossico e raggiungimento dello stato stazionario.
- ✓ Il raggiungimento dello stato stazionario dipende dall'emivita del tossico e dalla frequenza di somministrazione. Per aversi stato stazionario, il tossico deve essere somministrato ad intervalli di tempo inferiori a 5 emivite.
- ✓ È quindi importante conoscere l'emivita del tossico per prevedere l'entità dell'esposizione.

FATTORI INFLUENZANTI LA TOSSICITÀ

Si può avere accumulo del danno anche senza accumulo del tossico. Infatti il tempo di recupero del danno è spesso maggiore del tempo necessario all'eliminazione del tossico dall'organismo.

Ad es., la somministrazione di etanolo causa deposito di lipidi nel fegato (steatosi); il tempo necessario per la scomparsa dei depositi di grasso epatici è molto più lungo di quello necessario all'eliminazione dell'etanolo.

FATTORI INFLUENZANTI LA TOSSICITÀ

Per definire una dose tossica, un intervallo di dosi tossiche, è necessario indicare la durata dell'esposizione.

Frequenza: negli studi prolungati, la sostanza viene in genere aggiunta al cibo (o all'acqua) ⇒ frequenza di somministrazione elevata. In caso di somministrazione parenterale, in genere 1 somministrazione/giorno.

FATTORI INFLUENZANTI LA TOSSICITÀ

Controlli.

È necessario avere un gruppo di controllo, per:

- ✓ **incidenza di effetti (patologie) non indotti dalla sostanza (fattori congeniti e/o ambientali) ⇒ comparazione statistica.**

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

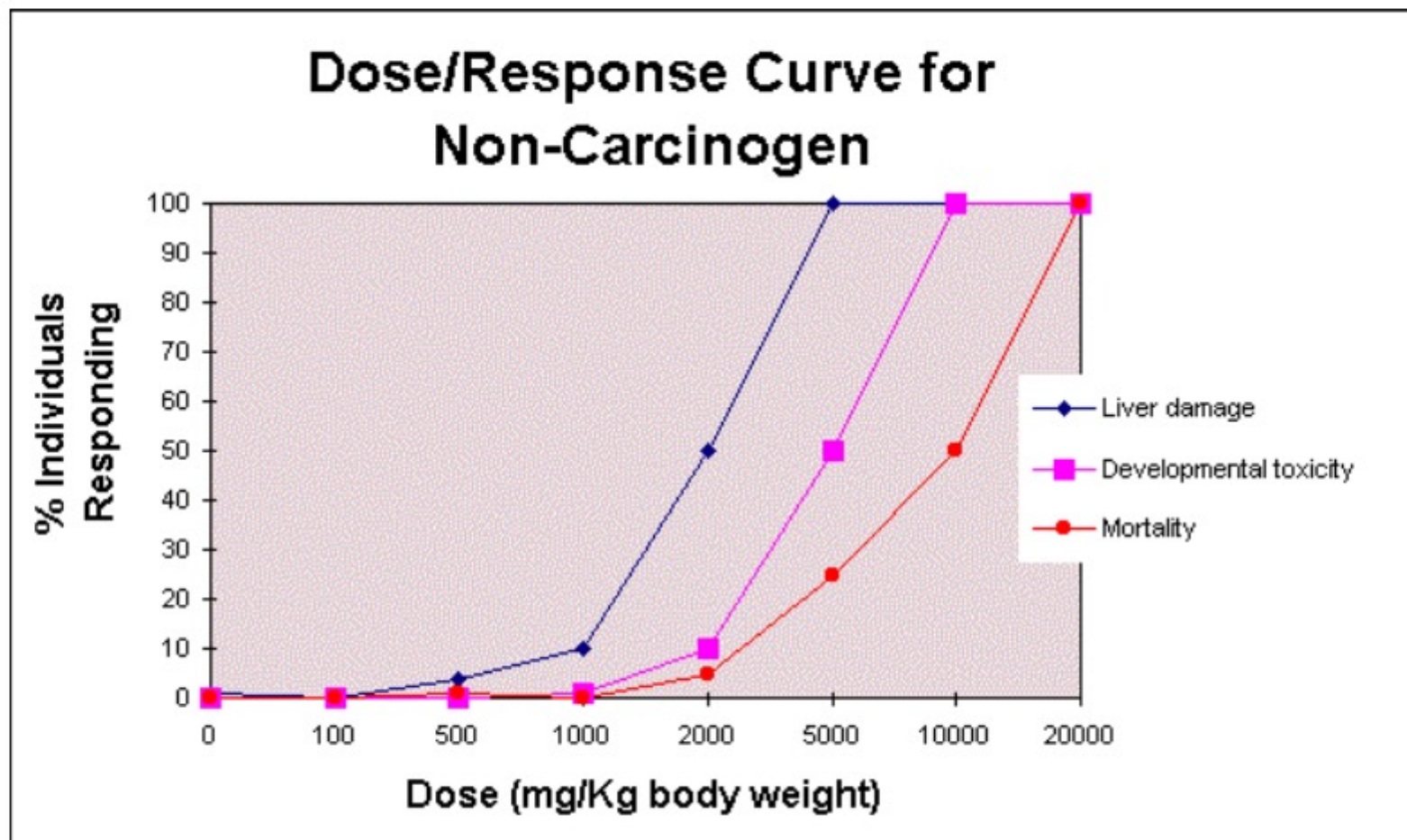
Sostanze con DL50 maggiori non hanno bisogno di etichettatura.

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.