

# **Valutazione del rischio chimico**

CdL Magistrale Interateneo in  
Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio  
Università di Udine e Università di Trieste

CdL Magistrale in Chimica  
Università di Trieste

Docente  
Pierluigi Barbieri

**SSD Chimica dell'ambiente e dei beni culturali, CHIM/12**

# *Valutazione del rischio chimico*

*Processo chimico*



*(Emissioni)*



*(Dispersione  
Trasferimenti di fase  
trasformazioni ambientali)*



*Esposizione / PEC*



***Valutazione  
del rischio***



*Valutazione degli **effetti** dell'esposizione  
a sostanze singole e a miscele /  
NOAEC /tossicologia*

# Valutazione della tossicità per la valutazione del rischio per la salute umana (RAoC cap.6)

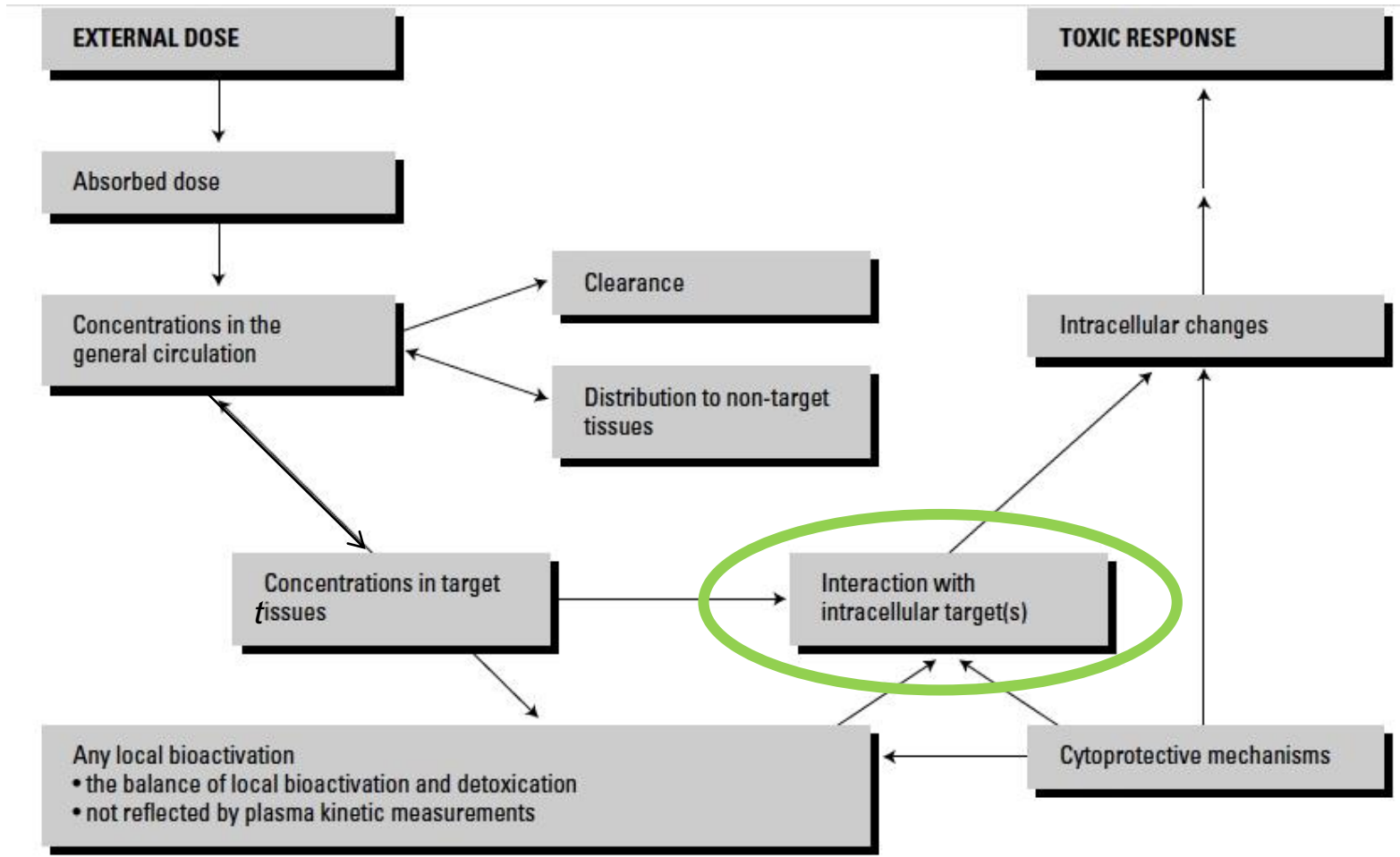
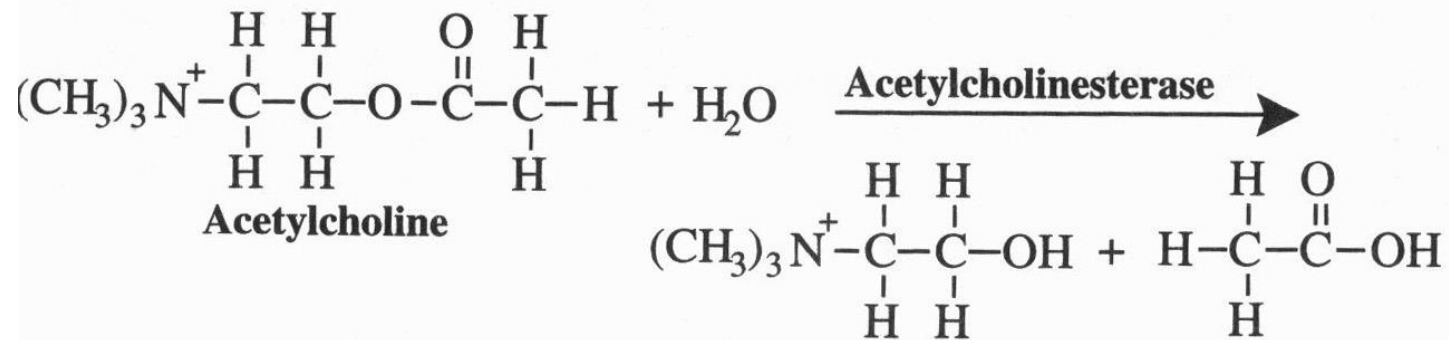


Figure 6.1. Processes leading to the generation of a toxic response [2].  
 Note: "Concentrations" refers to the relevant active form delivered by the general circulation and may be the parent compound or an active metabolite produced in another tissue and delivered to the target tissue or organ

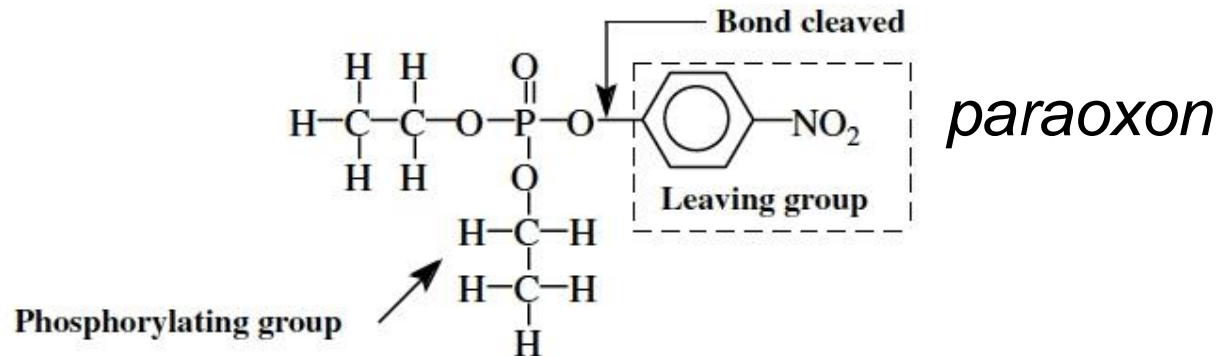
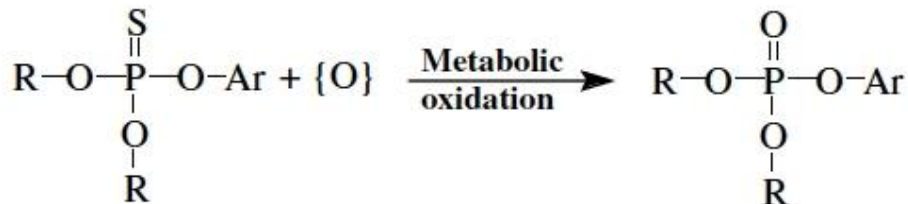
## Interazioni

### RECETTORI e sostanze tossiche

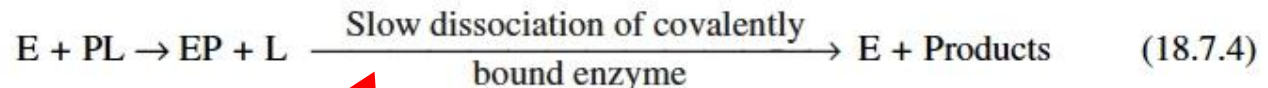
Un esempio di **funzionamento normale**: l'acetilcolina è un neurotrasmettitore che deve essere idrolizzato enzimaticamente (dall'acetilcolinesterasi) per evitare eccessiva stimolazione da parte ai recettori nervosi

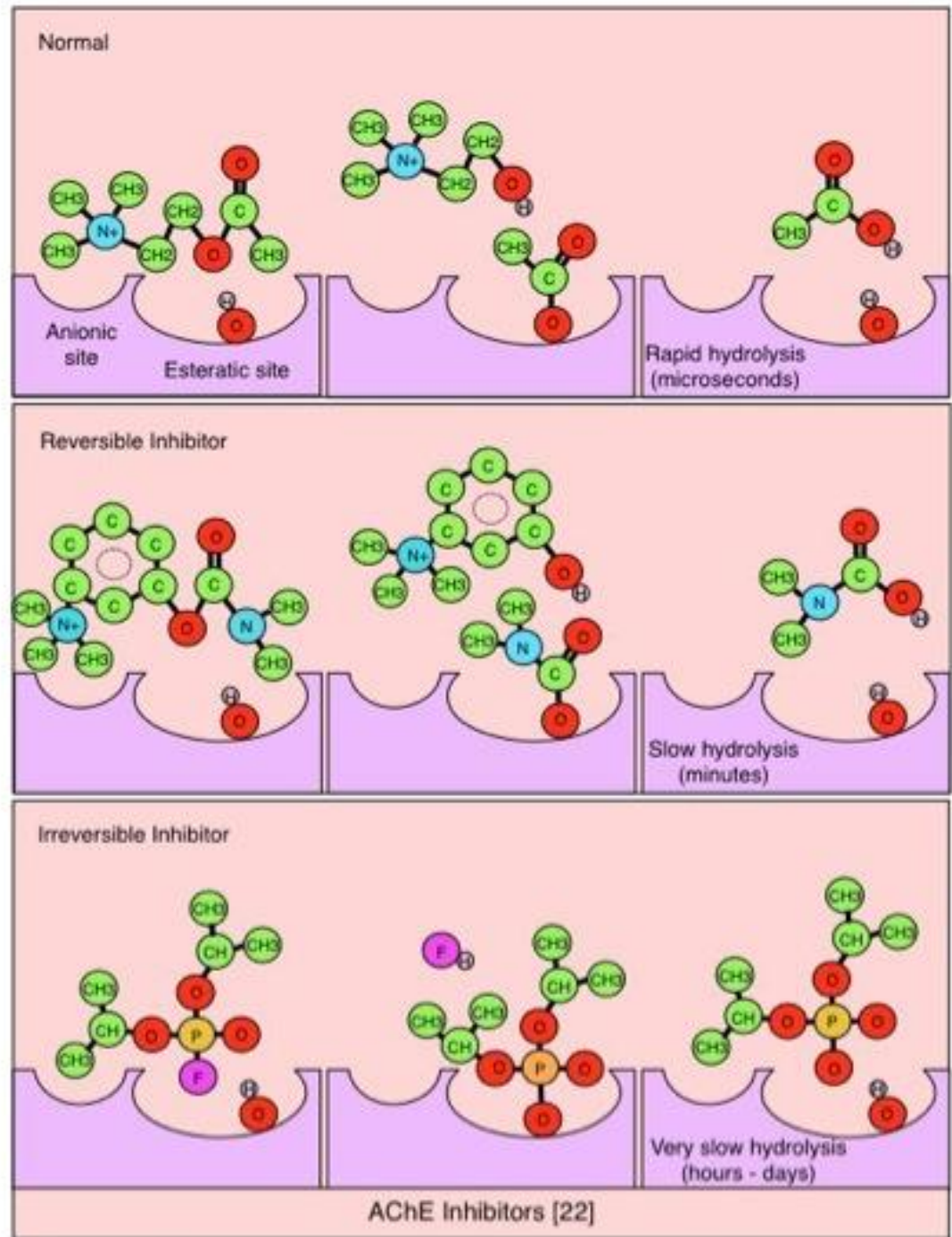
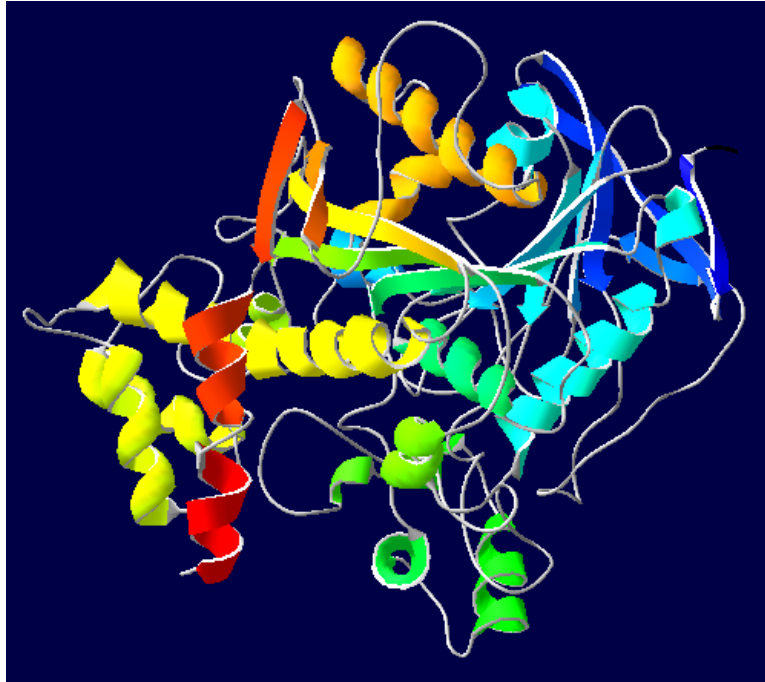


*Parathion*       $\rightarrow$       *Paraoxon attivazione*

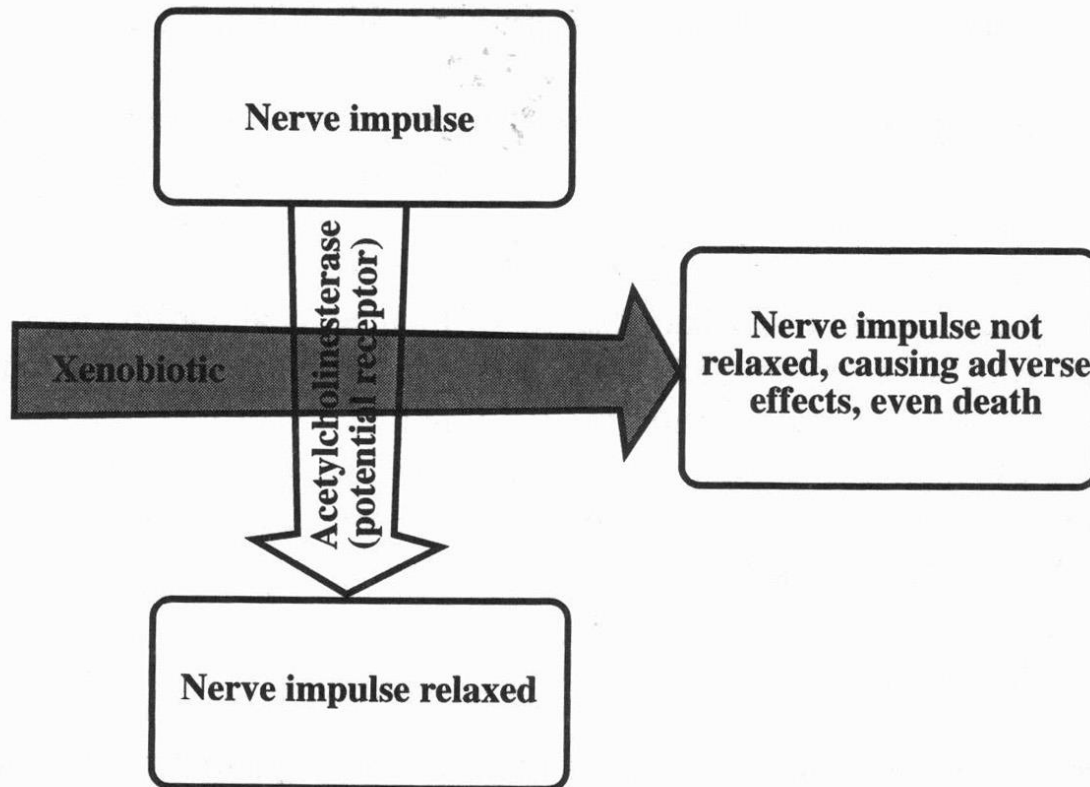


The reaction of this compound with cholinesterase enzyme (E) can be represented by the following reaction:





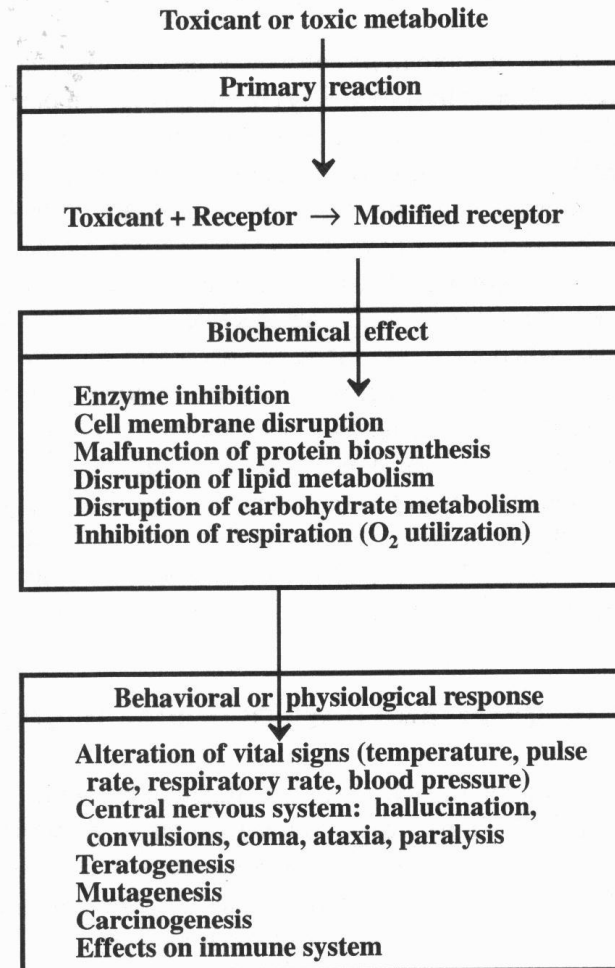
# Tossicologia – recettori e sostanze tossiche



Example of a toxicant acting on a receptor to cause an adverse effect. When acetylcholinesterase is bound by a xenobiotic substance, the enzyme does not act to stop nerve impulse. This can result in paralysis of the respiratory system and death.

# Tossicologia – fasi di tossicità

Dopo la *fase cinetica*, che trasporta la specie tossica al recettore, inizia la *fase dinamica*



Different major steps in the overall process leading to a toxic response.



# **Tossicologia – tossificazione e detossificazione**

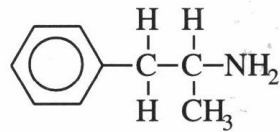
Composto genitore attivo

Metabolita attivo.

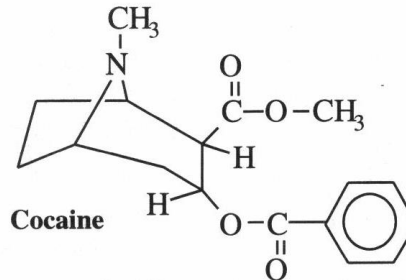
Effetti additivi / sinergici / di potenziamento /

Effetti antagonisti / “blockers” (competizione per un sito)

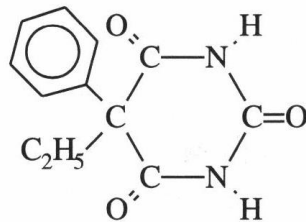
# Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



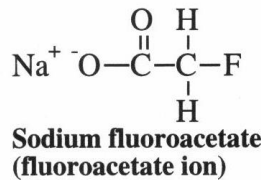
**Amphetamine  
(benzedrine)**



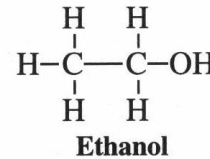
**Cocaine**



**Phenobarbital  
(a barbiturate)**

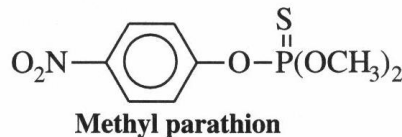


**Sodium fluoroacetate  
(fluoroacetate ion)**

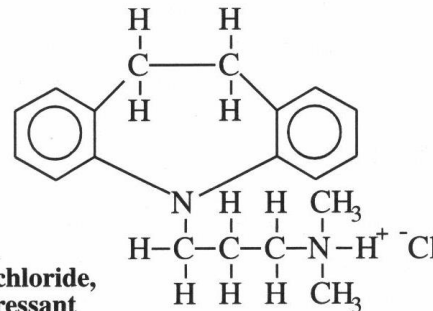


**Ethanol**

Examples of toxicants that affect body temperature. Amphetamine, cocaine, and fluoroacetate increase body temperature; phenobarbital and ethanol decrease it.



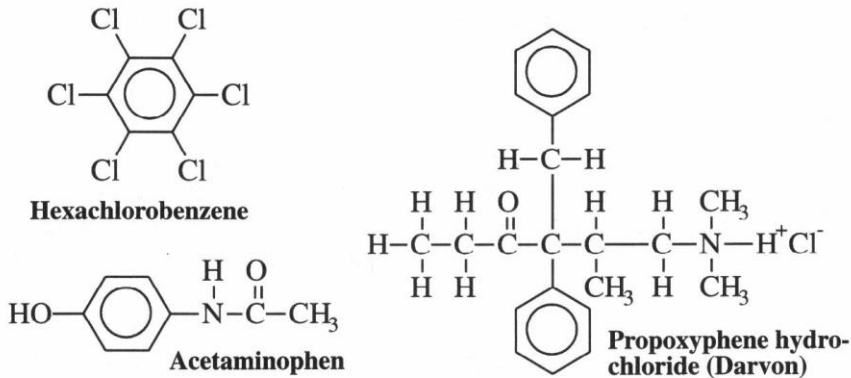
**Methyl parathion**



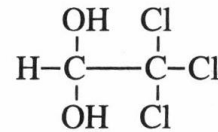
**Imiprimine hydrochloride,  
a tricyclic antidepressant**

Structures of toxicants that can affect pulse rate. Methyl parathion, a commonly used plant insecticide, can cause bradycardia. Imiprimine hydrochloride, a tricyclic antidepressant, can cause either tachycardia or arrhythmia.

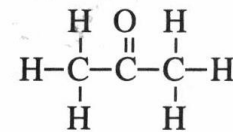
# Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



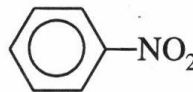
Some compounds that affect respiratory rate. Acetaminophen is one of the simple analgesics, which in therapeutic doses relieves pain without any effect on an individual's consciousness. Propoxyphene hydrochloride is a narcotic analgesic, a class of substances that can cause biochemical changes in the body leading to chemical dependency.



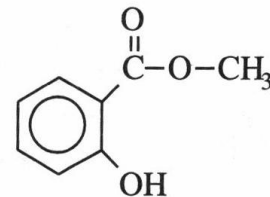
**Chloral hydrate**  
(pear odor)



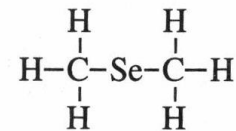
**Acetone**  
(acetone odor)



**Nitrobenzene**  
(shoe polish)



**Methyl salicylate**  
(wintergreen)



**Dimethyl selenide**  
(garlic)

# Tossicologia – effetti riproduttivi e sullo sviluppo

## Effetti tossici sullo sviluppo

World Health Organization. Regional Office for Europe & European Centre for Environment and Health. (2005). *Effects of air pollution on children's health and development : a review of the evidence*. Copenhagen : WHO Regional Office for Europe. <http://www.who.int/iris/handle/10665/107652>

Es .P Grandjean, PJ Landrigan *Developmental neurotoxicity of industrial chemicals* The Lancet 368, 9553, 2167-2178 (2006) (1549 citazioni – al 08/05/2019)  
<http://www.hiltrudbreyer.eu/media/doc/1180101446346.pdf>

## Effetti teratogeni (talidomide) (primo trimestre di gravidanza)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3643972/> (inquinanti ambientali?)

## Effetti sul sistema riproduttivo

Es. White JT, Kovar E, Chambers TM, Sheth KR, Peckham-Gregory EC, O'Neill M, Langlois PH, Jorgez CJ, Lupo PJ, Seth A *Hypospadias Risk from Maternal Residential Exposure to Heavy Metal Hazardous Air Pollutants*. Int J Environ Res Public Health. 2019 Mar 15;16(6). pii: E930. <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/6/930>

## Effetti mutageni

(alterazioni del DNA, se irreversibili possono portare a cancerogenesi)

## Effetti sul sistema immunitario

Es. Irva Hertz-Picciotto Hye-Youn Park Miroslav Dostal Anton Kocan Tomas Trnovec Radim Sram *Prenatal Exposures to Persistent and Non-Persistent Organic Compounds and Effects on Immune System Development* Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 102, 146–154 (2008)

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1742-7843.2007.00190.x>

## Studi sulla tossicità

Molti aspetti critici ci si riferisce spesso alla “**bibbia**” **gialla del WHO/OMS** “*Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals: Part I*”;

Indicazioni sono reperibili anche su “*Guidelines for testing chemicals*” dell’OECD/OCSE

Bada a:

- Proprietà chimiche

- vie d’esposizione

- Selezione e cura degli animali (dieta e condizioni di stabulazione)

- Acquisizione dei dati e presentazione e interpretazione dei risultati

- Good laboratory practices (US-FDA, USEPA, OECD, EC)*

Incertezze nei test su animali *UN International Program on Chemical Safety (1978)*

( !!! EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing

<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam> : metodi *in vitro* e *in silico* !!!)

# **Aspetti generali**

**Test substance**

**Dose selection**

**Animal species**

**Test duration**

**Diet**

**Other environmental variables**

**Parameters studied**

**Electronic data processing**

**Presentation of results**

**Interpretation and evaluation of results**

**GLP**

**Requisiti del personale**

**Benessere degli animali**

**Dati umani**

**Incertezza e variabilità**

International Program on Chemical Safety. 1978.  
Principles and methods for evaluating the toxicity  
of chemicals. Part I. World Health Organization,  
*Environmental Health Criteria 6.*

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc006.htm>

## **Test di tossicità acuta:**

*singola dose o dosi ripetute nelle 24 ore*

*Esiti rilevati entro 14 giorni dall'esposizione*

*Richiesto nel REACh (esposizione orale se non sono disponibili dati di e. inalatoria) per sostanze con produzione importazione maggiore di 1 tonnellata/anno; per più di 10 t/y serve test su ulteriore via d'esposizione.*

*Si verifica in genere letalità*

## **Test acuti locali**

*Irritazione e corrosione* *richiesti nel REACh per sostanze con t/y >10*

*“Irritant substances are non-corrosive substances which cause inflammation as evidenced by erythema and oedema of the skin and corneal opacity, iridal effects and conjunctival redness or swelling for the eye. Corrosive substances may destroy living tissues.”*

*In vivo su conigli / no dose-risposta, no LOEL*

*Sensibilizzazione* *richiesto nel REACh per sostanze con t/y >1*

Skin sensitization (-> allergic contact dermatitis) is a common form of allergy. Following skin exposure, it develops in 2 phases: induction (sensitization) and elicitation. 1) a primary immune response is triggered following a reaction between the chemical allergen and skin protein. 2) if the sensitized individual comes in contact with the same chemical allergen again in a later stage, a more pronounced secondary response is induced

es Valutazione in silico <http://www.caesar-project.eu/index.php?page=results&section=endpoint&ne=2>



# Test di tossicità acuta

Table 5.2. Acute toxicity tests

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, dermal, inhalatory
Experimental animals	rat, (mouse), rabbit, guinea pig, (dog)
Number of animals	5 of each sex per group
Dose levels	control and at least 3 or more if necessary for calculating LD50 or LC50 <sup>a</sup>
Examinations	<ul style="list-style-type: none"><li>- clinical examination for signs of toxicity or death</li><li>- gross examination</li><li>- histopathological examination if indicated</li></ul>
Results	the LD50 or LC50 value for each sex at 95% confidence interval

<sup>a</sup> If a dose of 2000 mg/kg<sub>bw</sub> does not cause acute toxicity and compound-related mortality, a full study may not be necessary.

Table 5.4. Evaluation and interpretation of results of acute toxicity tests (fixed dose procedure)

Dose	Results	Interpretation
5 mg/kg <sub>bw</sub>	less than 100% survival	compounds which are <i>very toxic</i>
	100% survival; but evident toxicity	compounds which are <i>toxic</i>
	100% survival; no evident toxicity	see results at 50 mg/kg
50 mg/kg <sub>bw</sub>	less than 100% survival	compounds which may be <i>toxic</i> or <i>very toxic</i> ; see results at 5 mg/kg
	100% survival; but evident toxicity	compounds which are <i>harmful</i>
	100% survival; no evident toxicity	see results at 500 mg/kg
500 mg/kg <sub>bw</sub>	less than 100% survival	compounds which may be <i>toxic</i> or <i>harmful</i> ; see results at 50 mg/kg
	100% survival; but evident toxicity	compounds considered as having no significant acute toxicity
	100% survival; no evident toxicity	see results at 2000 mg/kg
2000 mg/kg <sub>bw</sub>	less than 100% survival	see results at 500 mg/kg
	100% survival; with or without evident toxicity	compounds which do not have significant acute toxicity

## Tossicità per dosi ripetute

Più che a dosi elevate a seguito di incidenti gli esseri umani possono essere esposti ripetutamente a basse dosi di contaminanti ambientali

Esempi di test con somministrazioni ripetute ad animali da esperimento sono la prova sub-acuta di 28 giorni, il test subcronico di 90 giorni e il test cronico per la durata di vita. Il requisito minimo di solito è la prova di 14 o 28 giorni con ratti.

In base al REACH, è richiesto uno studio di tossicità a dose ripetuta (almeno una prova di 28 giorni) per un livello annuale di produzione o di importazione di 10 tonnellate

Si ottengono informazioni su quelli che sono gli organi bersaglio, relazioni dose/risposta, NOAEL o BDC  
Ratti e cani, usualmente giovani (più sensibili)

Table 5.5. Repeated dose studies (28 and 90 d)

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, dermal, inhalatory
Experimental animals	rat (mouse, dog)
Number of animals	5 to 10 of each sex per group <sup>a</sup>
Dose levels	control and at least 3 dose levels with an increment of 2 to 10 (sometimes satellite groups)
Examinations	<ul style="list-style-type: none"> <li>- body weight, food consumption and water consumption</li> <li>- clinical examination. haematological parameters: haematocrit, haemoglobin concentration, erythrocyte counts, total and differential leukocyte count, clotting potential; biochemical parameters: including organ function, parameters, electrolyte balance, carbohydrate metabolism, serum salts (Ca, P, Na, K, Cl), glucose, serum enzymes, urea nitrogen, albumen, serum protein, creatinin, bilirubin (lipids, hormones, methaemoglobin, choline-esterase activity), urine analysis</li> <li>- gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy</li> <li>- organ weights</li> <li>- histopathological examination: of all preserved organs and tissues (30 or more) of highest dose and control. If indicated, intermediate and low dose groups</li> </ul>
Results	information concerning effects of repeated dose exposure for parameters measured, target organ(s); if possible, mechanism of action and NOAEL

<sup>a</sup> For a range finding test 5 animals per sex per group may be sufficient for experiments with dogs, usually groups of 4 to 5 animals per sex are used.

Table 5.6. Chronic toxicity studies (6 to 24 months)

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, inhalatory
Experimental animals	rat (mouse, dog)
Number of animals	20 (dogs 4 to 5) per sex per group
Dose levels	control and at least 3 dose levels with an increment of 2 to 10 (sometimes satellite groups)
Examinations	<ul style="list-style-type: none"> <li>- body weight, food consumption and water consumption during the first 13 weeks at weekly intervals and later at 4 week intervals (body weight) or 3 month intervals (food and water consumption)</li> <li>- clinical examination: haematological and biochemical examination and urine analysis (Table 5.5) at onset of study and at 6 month intervals</li> <li>- gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy</li> <li>- organ weights</li> <li>- histopathological examination in full of all preserved organs and tissues of highest dose and controls. If indicated, of intermediate and lowest dose</li> </ul>
Results	information concerning effects of repeated dose exposure on parameters studied, target organ(s); if possible, mechanism of toxicity and NOAEL

# **Genotossicità**

La genotossicità si riferisce a effetti potenzialmente dannosi sul materiale genetico. Include la mutagenicità che può essere definita come l'induzione di cambiamenti trasmissibili permanenti nella quantità o struttura del materiale genetico.

I test di genotossicità forniscono anche indicazioni di altri danni al DNA attraverso *sintesi di DNA non programmato*, *scambio di cromatidi fratelli* (scambio di porzioni omologhe di DNA tra i due cromatidi costituenti un cromosoma), *rottture di filamento*, *formazione di addotti*, *ricombinazione mitotica* e *aberrazioni del numero di cromosomi* (aneuploidia - variazione nel numero dei cromosomi, rispetto a quello che normalmente caratterizza le cellule di un individuo).

I test di genotossicità sono molto utili come pre-screening di potenziale carcinogenicità genotossica

Regolamento REACH: Il requisito di base è un test di Ames su batteri per le mutazioni per un quantitativo di sostanza annuale di 10 tonnellate.

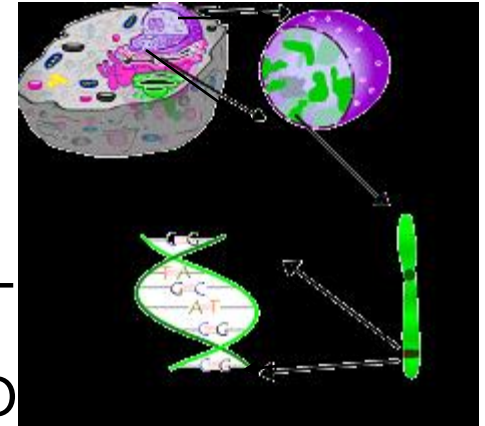
**Il test di Ames**, ideato da Bruce Ames nel 1973, è un test genetico per l'analisi della genotossicità di una sostanza.

Si basa sulla *valutazione della capacità di un sospetto mutageno di provocare la reversione di un carattere auxotrofo his- in un ceppo di batteri mutato (Salmonella typhimurium), rendendolo nuovamente capace di sopravvivere in un terreno privo di istidina.*

Essendo condotto in cellule batteriche, il test di Ames non consente di valutare la capacità dei mutageni di alterare la struttura cromosomica del DNA umano.

Va eseguito insieme a test su cellule eucariotiche (test dei micronuclei, test della cometa, quantificazione degli addotti al DNA) e su animali in vivo. Vi è comunque una buona correlazione fra l'effetto mutageno riscontrato nel test di Ames e la cancerogenità della sostanza

# Test della Cometa (SCGE)



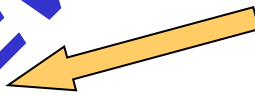
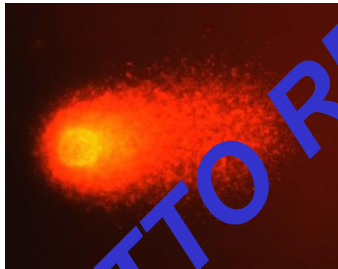
PRINCIPIO



LE ROTTURE DEL  
FILAMENTO DEL  
DNA SI POSSONO  
EVIDENZIARE  
TRAMITE  
L'ELETTROFORESI



OSSERVAZIONE AL  
MICROSCOPIO A  
FLUORESCENZA



**EFFETTO REVERSIBILE**

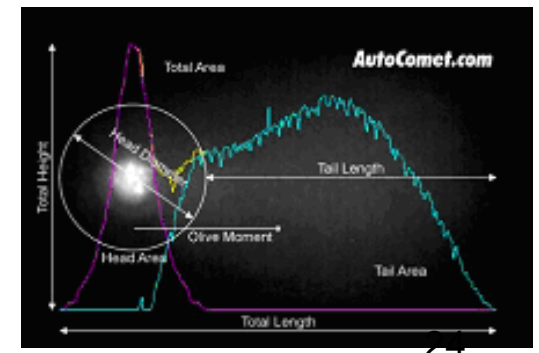




Table 5.7. Carcinogenicity studies

---

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, inhalatory
Experimental animals	rat, mouse, (dog), (monkey)
Number of animals	50 per sex per group (sometimes satellite groups); dogs and monkeys usually not more than 7 to 10 per group
Dose levels	control and at least 3 dose groups, for proper quantitative risk assessment more dose groups
Examinations	<ul style="list-style-type: none"><li>- body weight, food consumption and water consumption at various intervals (see Table 5.6)</li><li>- clinical examination at intervals (see Table 5.6) of 10 to 20 animals per sex per group</li><li>- gross examination: daily observation and extensive gross examination on termination</li><li>- histopathological examination in full of highest dose and controls where indicated, for other dose levels</li></ul>
Results	information on carcinogenic properties, tumour incidence in relation to dose, latency period, tumour multiplicity, potential for metastasis

---

Table 5.8. Genotoxicity tests

---

*Gene mutation assays*

Tests with prokaryotes

- *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay (OECD Guideline 471)
- *Escherichia coli* reverse mutation assay (OECD Guideline 472)

Tests with eukaryotes

- *Saccharomyces cerevisiae* gene mutation assay (OECD Guideline 480)
- *in vitro* mammalian cell gene mutation assay (OECD Guideline 476)
- *in vivo* sex linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster* (OECD Guideline 477)

*Chromosomal damage assays*

*In vitro* tests

- mammalian cytogenic test (OECD Guideline 473)
- chromatid exchange assay in mammalian cells (OECD Guideline 479)

*In vivo* tests

- mammalian bone marrow cytogenetic test for chromosomal analysis (OECD Guideline 475)
- micronucleus test (OECD Guideline 474)

*DNA damage/repair/adduct formation assays*

- DNA adduct formation 32P-post coupling [43]
  - DNA repair synthesis in mammalian cells *in vitro* (OECD Guideline 482)
  - DNA repair test in primary liver cells [44]
  - DNA repair *in vivo* [44]
-

Table 5.9. Types of adverse effects detected in reproductive toxicity [46]

Time and targets at which a substance initiates its toxicity	Examples of adverse effects on
<i>Adult toxicity</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- libido</li> <li>- behaviour</li> <li>- endocrine function</li> <li>- mating</li> <li>- gamete production</li> <li>- reproductive life span</li> </ul>
<i>Maternal toxicity</i> (changing physiology and metabolism during pregnancy and lactation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- susceptibility</li> <li>- ability to nurse</li> <li>- milk quality/quantity</li> </ul>
<i>Developmental toxicity</i> Pre-implantation and implantation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- fertilization</li> <li>- movement of fertilized ova</li> <li>- implantation</li> <li>- survival of ova</li> </ul>
Embryonic development	<ul style="list-style-type: none"> <li>- growth and differentiation</li> <li>- organ development</li> <li>- survival</li> </ul>
Placental development	<ul style="list-style-type: none"> <li>- growth</li> <li>- organ function</li> </ul>
Foetal development	<ul style="list-style-type: none"> <li>- growth and differentiation</li> <li>- organ function</li> <li>- survival</li> </ul>
Postnatal development (neonatal, pre-weaning, post-weaning, puberty)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- birth weight</li> <li>- organ function</li> <li>- hormone function</li> <li>- immune function</li> <li>- CNS and peripheral NS function</li> <li>- sexual function</li> <li>- other cellular functions (transplacental carcinogenesis)</li> <li>- survival</li> </ul>

Table 5.10. Approach to the development of *in vitro* test methods that might lead to regulatory acceptance [52]

Step	Requirements
Scientific justification	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Select simple endpoint essential for hazard identification</li> <li>2. Develop <i>in vitro</i> assays for these endpoints</li> <li>3. Understand the mechanism of the <i>in vitro</i> assay and demonstrate similarities to the target event</li> <li>4. Publish the assay(s) in a high quality peer-reviewed journal</li> </ol>
Database development	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. Conduct the <i>in vitro</i> assays parallel to the relevant <i>in vivo</i> studies</li> <li>6. Conduct and report all studies fully in accordance with GLP</li> <li>7. Integrate results of the <i>in vitro</i> assays in dossiers submitted to regulatory agencies</li> <li>8. Propose the <i>in vitro</i> assays to the OECD to be considered for test guideline development</li> </ol>

# MECCANISMI BIOCHIMICI DELLA TOSSICITA'

Quali sono i meccanismi e le reazioni tramite le quali i composti xenobiotici e i loro metaboliti interagiscono con le biomolecole per causare un effetto tossicologico avverso?

Per generare una risposta tossica, le sostanze devono essere spesso molto reattive

-> se introdotte direttamente nell'organismo, reagirebbero prima di raggiungere un bersaglio in dove causare l'effetto avverso.

-> se prodotte metabolicamente, possono trovarsi in un sito in cui interagire facilmente con le biomolecole, membrane o tessuti per causare la risposta tossica

Si possono identificare 4 categorie di specie tossiche in base alla reattività

- 1) **Specie elettrofile:** caricate positivamente o con cariche parziali positive -> hanno tendenza a legare atomi o gruppi funzionali ricchi di elettroni (N, O ed S che son abbondanti in acidi nucleici, proteine (tra le quali ci son gli enzimi)). Comuni.
- 2) **Specie nucleofile:** caricate negativamente o con cariche parziali negative -> hanno tendenza a legare atomi o gruppi funzionali poveri di elettroni. Meno comuni, ma significative (es. CO metabolico formato da dealogenazione ed ossidazione di alometani -> lega con  $\text{Fe}^{2+}$  di emoglobina, impedisce trasporto  $\text{O}_2$ ;  $\text{CN}^-$  prodotto da metabolismo di acrilonitrile -> lega con  $\text{Fe}^{3+}$  di ferricitocromo ossidasi, impedisce respirazione).

Si possono identificare 4 categorie di specie tossiche in base alla reattività

**3) Radicali liberi:** specie neutrali o ioniche che hanno elettroni spaiati (es. radical anione superossido  $O_2^{\cdot-}$ ; radicale idrossilico  $HO\cdot$ , prodotto dalla decomposizione omolitica di  $H_2O_2$ . Queste specie reagiscono con molecole più grandi per generare altri radicali liberi. Trasferimento elettronico da citocromo P 450 a  $CCl_4$  produce  $Cl_3C\cdot$  (terribile!  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12708612> ).

**4) Reagenti redox:** possono far decorrere reazioni di ossido-riduzione pericolose (es.  $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow$  ossidazione di  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  (metemoglobinemia; probabilmente co-fattore  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1247562/pdf/hp0112-001371.pdf> ))

Spesso sono importanti le interazioni tra specie tossiche e recettori

## Cos'è un recettore?

Nel presente contesto per **recettore** si intende un'entità biochimica che interagisce con una specie tossica per produrre un effetto avverso.

In genere i r. sono macromolecole (come proteine, acidi nucleici o fosfolipidi di membrane cellulari) interne alle o sulla superficie delle cellule.

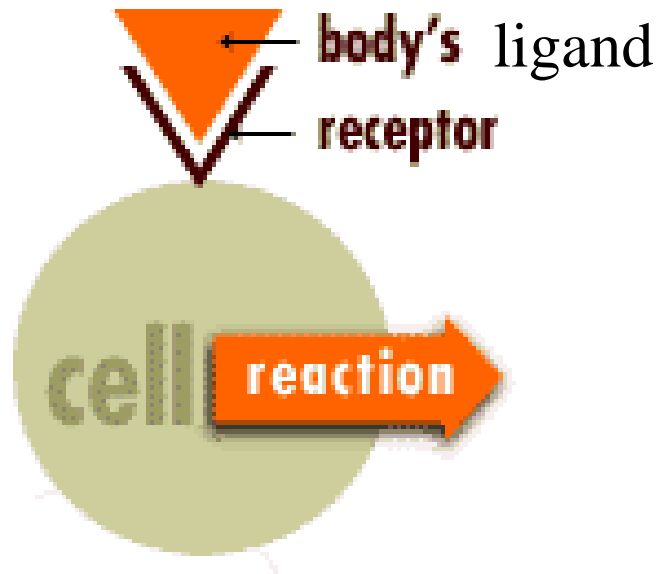
La sostanza che interagisce con un r. è detta **legante**.

I leganti sono di solito piccole molecole (*endogene* - come gli ormoni – o *xenobiotiche* – come molte sostanze tossiche)



La FUNZIONE del r. dipende dalla sua elevata specificità per particolari leganti; ciò implica spesso un adattamento stereochimico tra recettore e legante  
(simile a interazione tra enzima e substrato)

**normal**



Meccanismo “serratura e chiave”  
(*lock and key*)

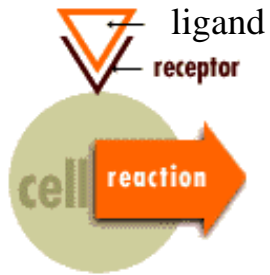
Si noti che reazioni tra r. e tossico sono spesso 100 x più forti di quelle tra enzimi e substrati.

Inoltre mentre gli enzimi alterano un substrato chimicamente (es tramite idrolisi), i tossici non alterano la natura dei recettori se non legandosi ad essi.

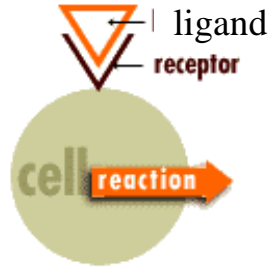
In molti casi l'identità del recettore NON è nota (es. insetticidi piretroidi). In tal caso, per il tossico X, ci si riferisce al recettore X.

Varie interazioni tra tossici e r. sono studiate in analogia con studi farmacologici (ove si studia l'interazione farmaco-recettore).

**excessive**



**insufficient**

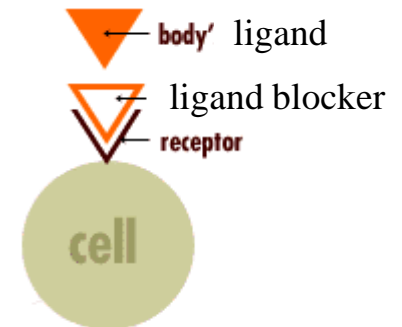


Azione diversa in grado  
(effetti avversi)

Azione antagonista

Si verifica anche se legame di tossico con un sito prossimo a r. ma tale che addotto ostacola stericamente il funzionamento di r.

**blocked**



Il recettore potrebbe anche non avere leganti endogeni

## **Interferenze con l'azione degli enzimi**

Gli enzimi devono funzionare correttamente per far funzionare i processi metabolici essenziali che avvengono nelle cellule.

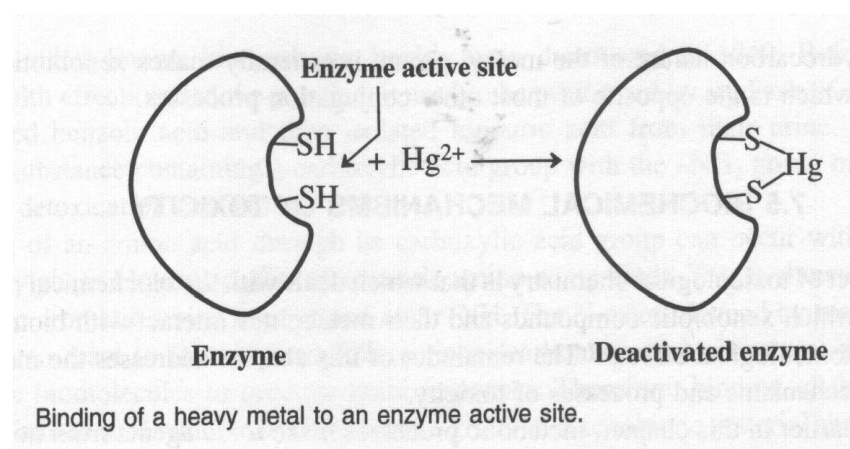
Xenobiotici a volte sono **inibitori di enzimi** che rallentano o bloccano gli e. dall'effettuare la loro normale funzione di catalizzatori biochimici.

L'**induzione enzimatica** è un processo per cui il corpo è stimolato a sintetizzare enzimi per un particolare scopo.

Alcuni inibitori enzimatici sono endogeni per controllare i processi catalizzati da e..

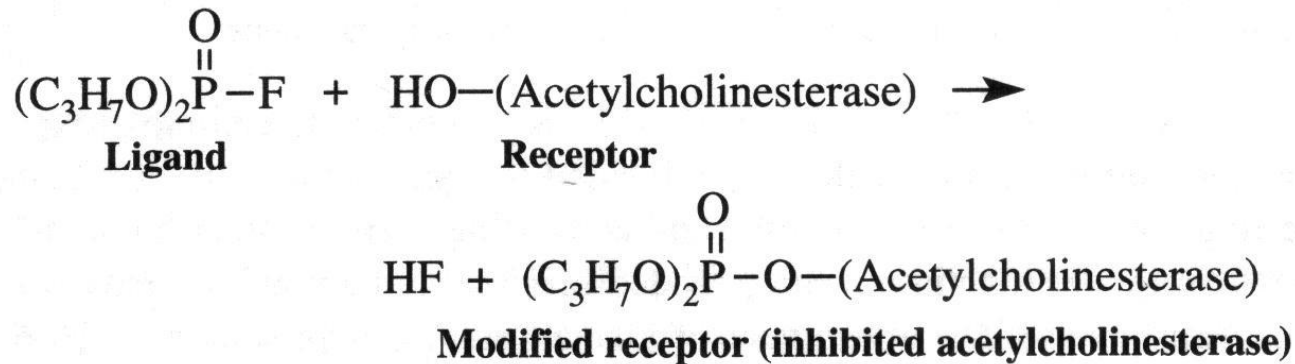
Esempio di inibizione dovuta a specie tossiche:

ioni di metalli pesanti  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  tendono a legarsi fortemente a gruppi funzionali contenenti zolfo ( $-\text{SS}-$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_3$ ) presenti nei siti attivi di e. inibendone il funzionamento.



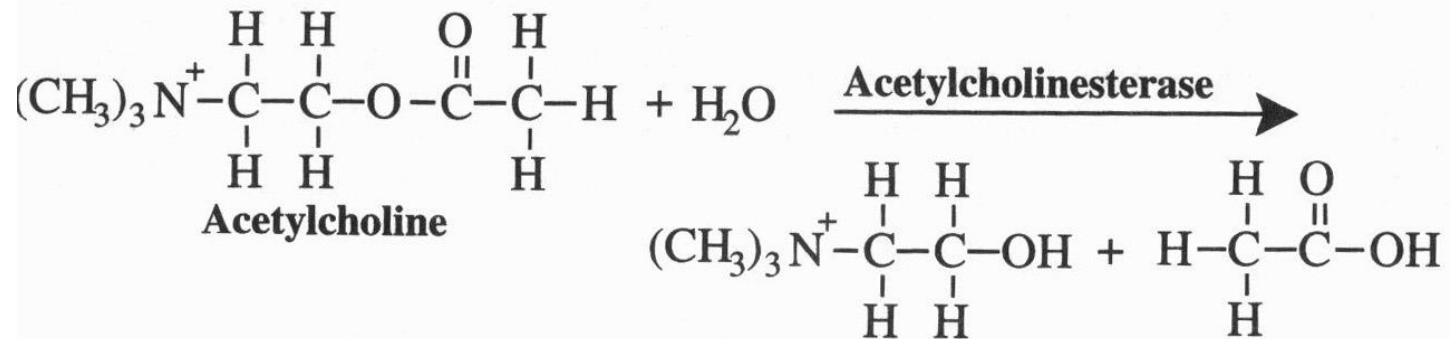
**Inibizione di metalloenzimi** (e. che contengono un metallo nella loro struttura) avviene spesso per sostituzione del metallo con un m. xenobiotico (es.  $\text{Cd}^{2+}$  sostituisce  $\text{Zn}^{2+}$  in ATPasi, alcol deidrogenasi)

**Inibizione dovuta a composti organici** che formano legami covalenti

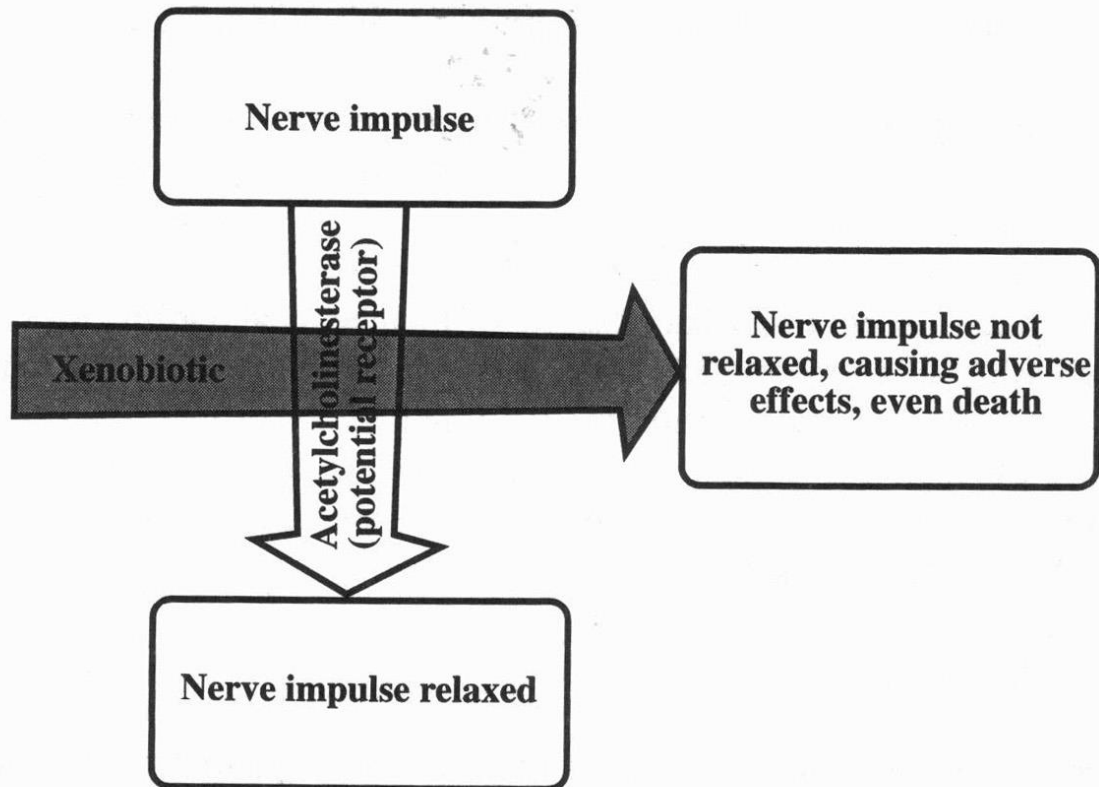


-> Effetti tossici su sistema nervoso  
 (il legante è un gas nervino - diisopropilfosfofluoridato)

## Tossicologia – recettori e sostanze tossiche



# Tossicologia – recettori e sostanze tossiche



Example of a toxicant acting on a receptor to cause an adverse effect. When acetylcholinesterase is bound by a xenobiotic substance, the enzyme does not act to stop nerve impulse. This can result in paralysis of the respiratory system and death.



# Biochimica della mutagenesi

La mutagenesi è il fenomeno per cui tratti ereditabili risultano da alterazioni del DNA

Mutazioni avvengono normalmente originando la diversità nelle specie, ma molte mutazioni sono dannose.

Specie tossiche che causano mutazioni son dette **mutagene** (spesso le stesse che causano tumori ed teratogenesi).

DNA contiene basi azotate *adenina, guanina citosina e timina*; l'ordine in cui si presentan nel DNA determina la struttura del RNA, sostanza prodotta per sintetizzare nuove proteine ed enzimi nelle cellule. Cambiare, aggiungere o sottrarre una qualsiasi di queste basi azotate altera la natura del RNA prodotto e può cambiare processi biologici vitali. Questo fenomeno, che può esser indotto da uno xenobiotico, è una mutazione che può esser passata alla progenie spesso con effetti deleteri.

Es. mutagenicità dell'acido nitrico nei batteri.

Tre basi azotate (A, G, C) contengono un amino gruppo  $-NH_2$

l'acido nitrico rimpiazza amino- gruppi con atomi di ossigeno con legami doppi, poi inserisce un cheto gruppo ( $C=O$ ) negli anelli delle basi azotate convertendole in altri composti ( $\rightarrow$  il DNA può non funzionare bene  $\rightarrow$  mutazione)

**Alchilazioni** possono inserire un piccolo gruppo alchilico (metile o etile) su di un N di basi azotate

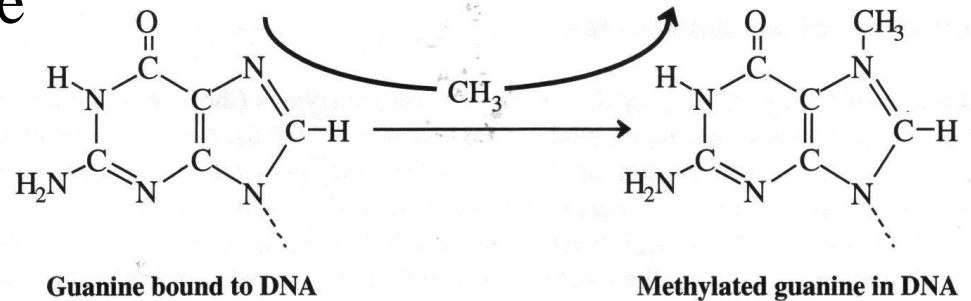


Figure 7.14 Alkylation of guanine in DNA.

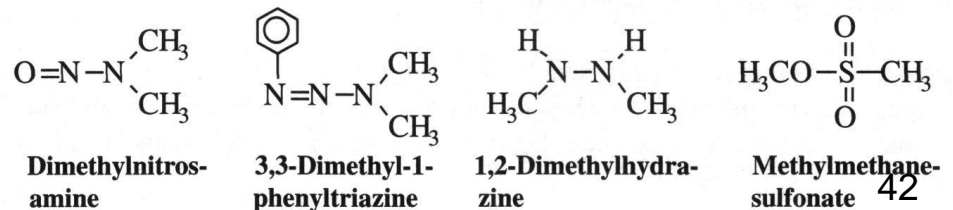
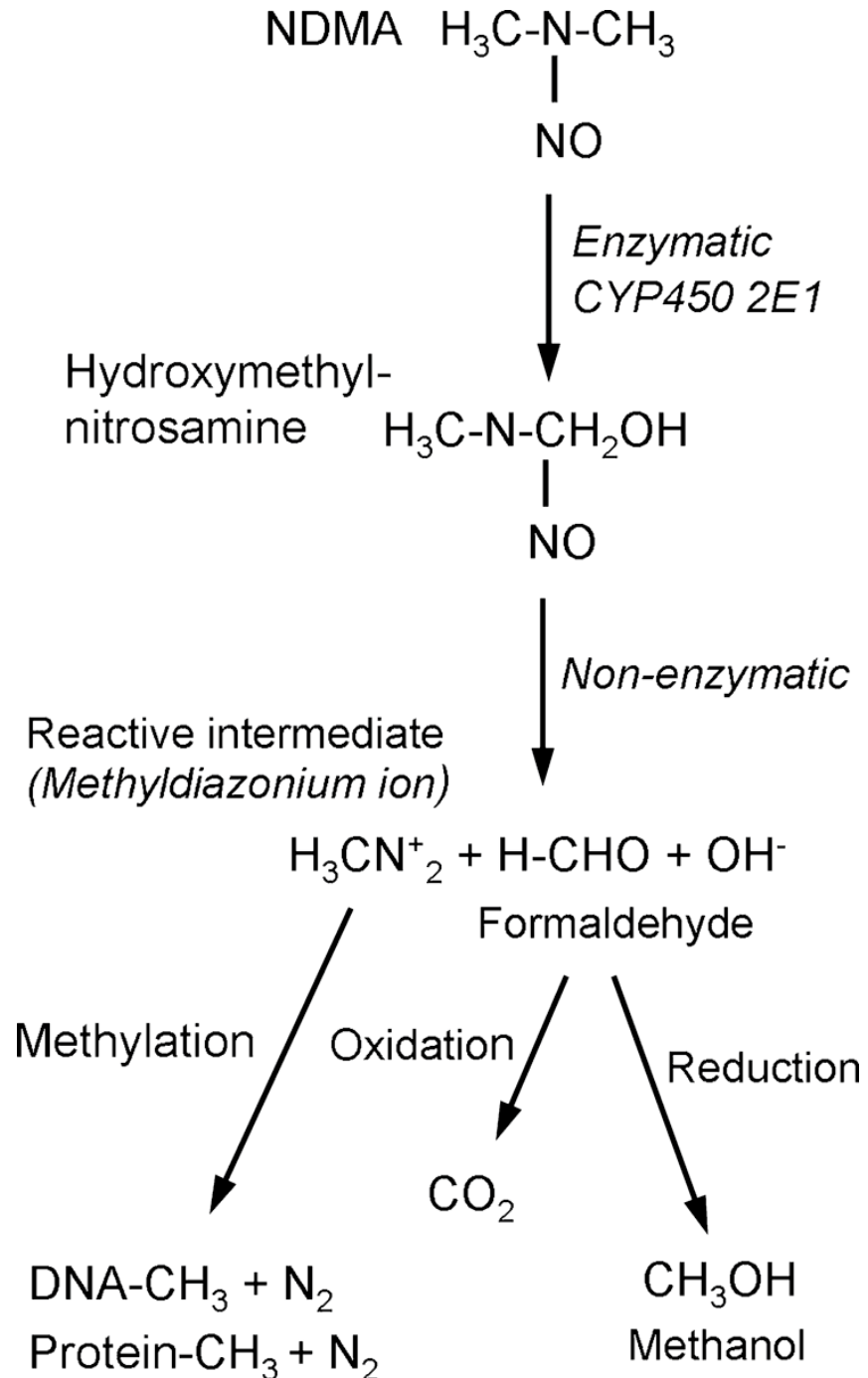
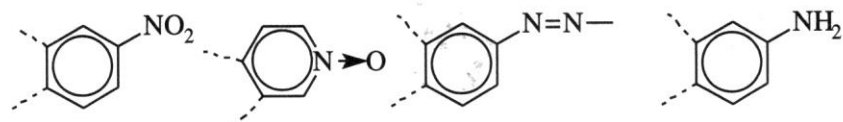


Figure 7.15 Examples of simple alkylating agents capable of causing mutations.

Es. Dimetil nitrosamina  
 è attivata generando  
 intermedio reattivo

<https://www.nature.com/articles/s41419-018-1272-8> (2019)



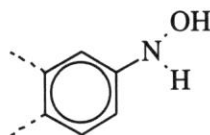


**Aromatic nitro groups**

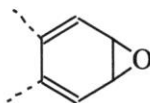
**Aromatic ring N-oxides**

**Aromatic azo groups that may be reduced to aromatic amines**

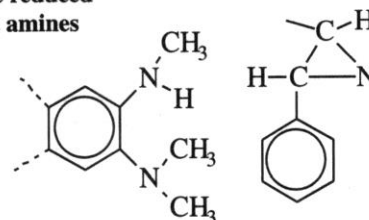
**Aromatic amines**



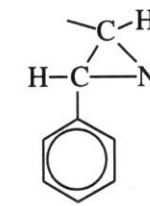
**N-hydroxy derivatives of aromatic amines**



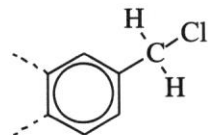
**Aromatic epoxides**



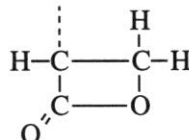
**Aromatic alkyl-amino group**



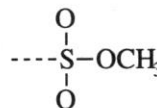
**Aziridinyl groups**



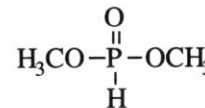
**Substituted primary alkyl halides**



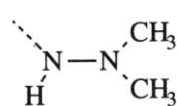
**Propiolactones, propiosultones**



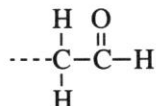
**Alkyl esters of sulfonic acid**



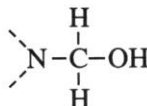
**Alkyl esters of phosphonic acid**



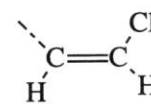
**Alkyl hydrazines**



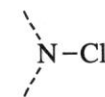
**Alkyl aldehydes**



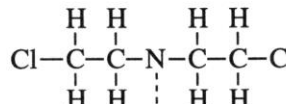
**N-methylol compounds**



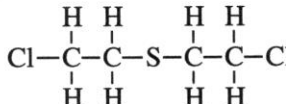
**Monohaloalkenes**



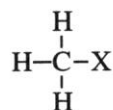
**N-chloramines**



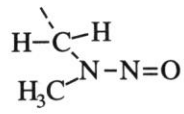
**N mustards**



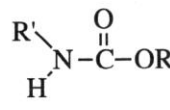
**S mustards**



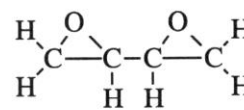
**Halogenated methanes**



**Alkyl-N-nitrosamines**



**Carbamates**



**Aliphatic epoxides**

8.4 Functionalities commonly associated with genotoxicity and mutagenicity. These groups are used in structure-activity relationships to alert for possible carcinogenic substances.

# Biochimica della cancerogenesi

Il cancro è una condizione caratterizzata dalla replica e crescita incontrollata delle cellule di un corpo (cellule somatiche)

Agenti cancerogeni:

chimici (es. nitrosamine o IPA)

biologici (es. alcuni virus)

radiazioni ionizzanti (es. raggi X)

fattori genetici (es. selezioni genetiche)

La cancerogenesi chimica è prodotta da specie chimiche xenobiotiche

Storia: 1775 spazzacamini inglesi e cancro allo scroto <- fuliggine e catrame

Lavoratori nelle industrie di coloranti (D) e cancro alla vescica dovuto a prodotti estratti dal catrame ( exp.  2-Naphthylamine ) 45

# Due passaggi principali nella cancerogenesi chimica:

iniziazione e promozione

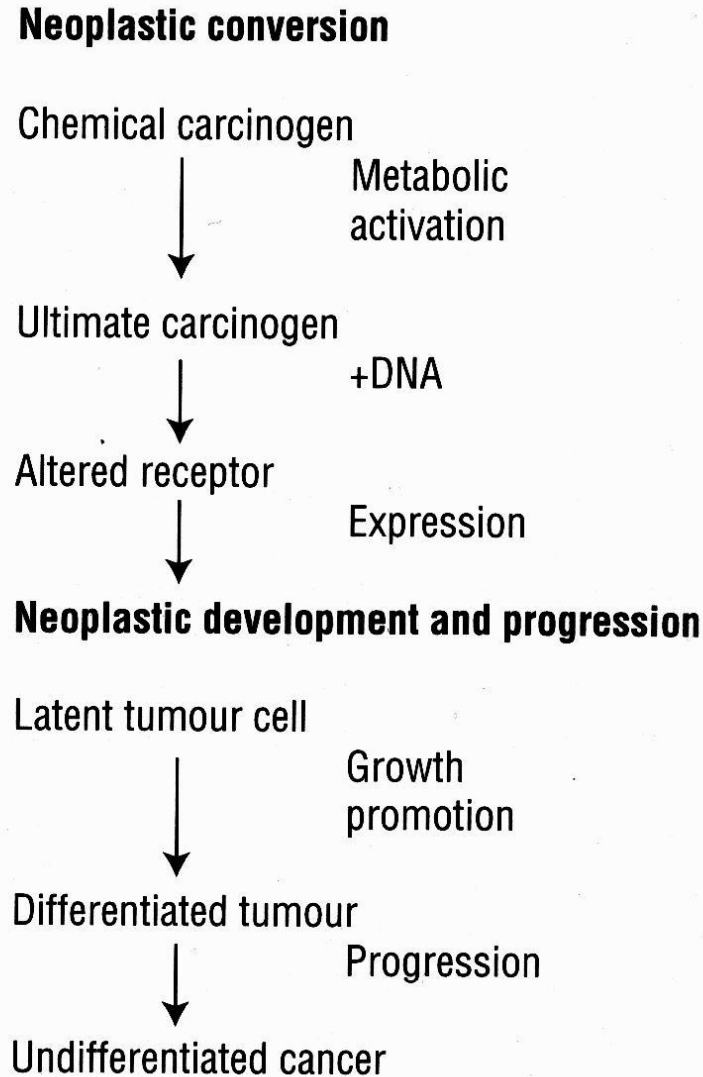


Figure 5.7. Neoplastic conversion, development and progression. From Williams [71]. With permission.

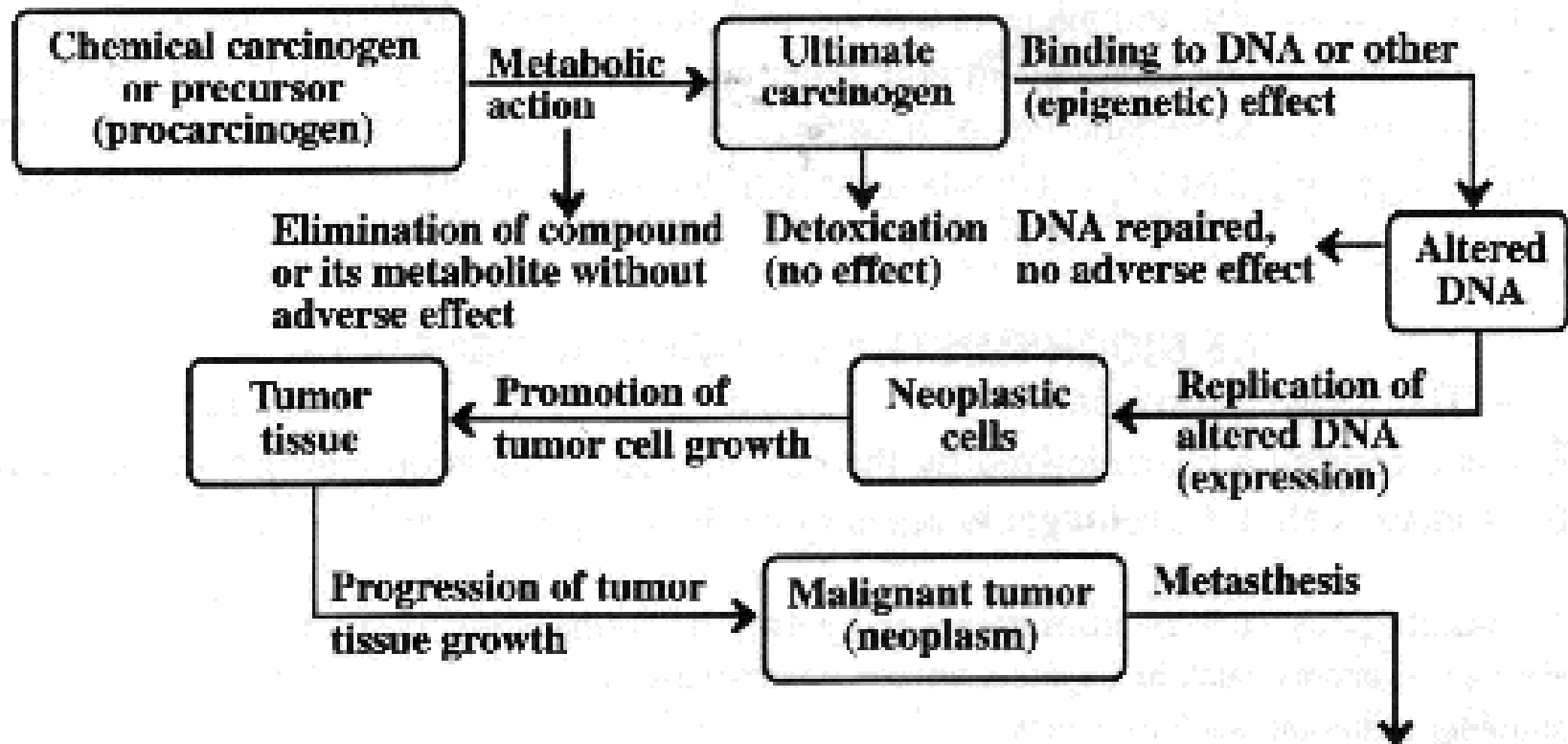
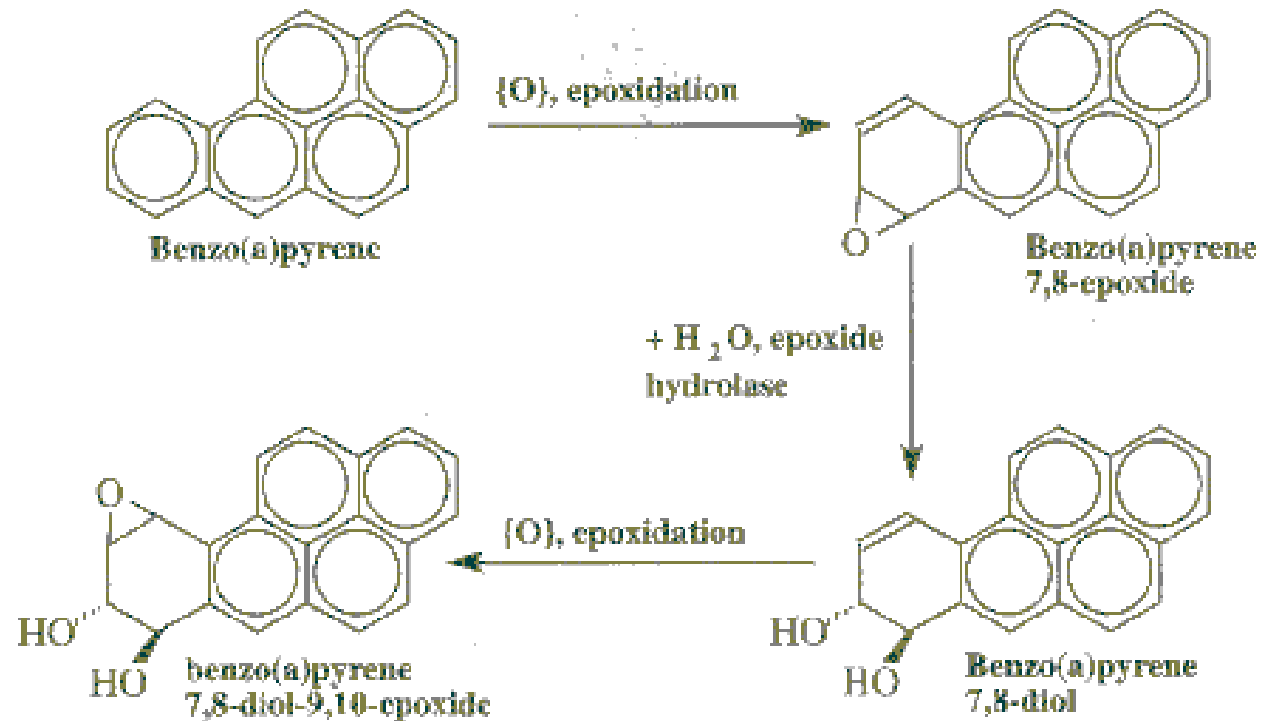


Figure 7.16 Outline of the carcinogenic process.

Es. specie procancerogene - cancerogene prossimali (*proximate c.*) -  
cancerogene definitive (? - *ultimate carcinogen*)

## idratazione degli epossidi

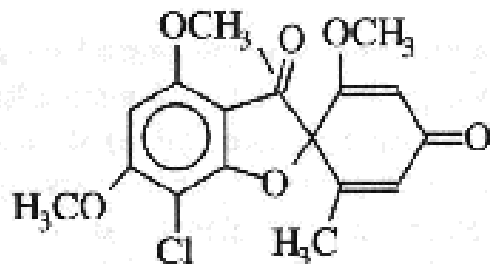
*trans* diidrodoli, a volte meno tossici perchè meno reattivi  
degli epossidi, ma benzo(a) pirene è procancerogeno,  
-> prodotto cancerogeno



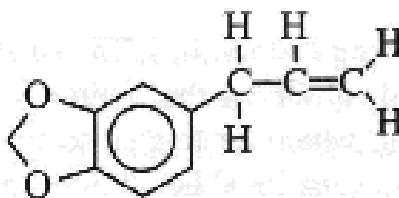
- 3 Epoxidation and hydroxylation of benzo(a)pyrene (left) to form carcinogenic benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide.



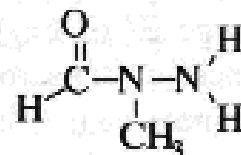
**Naturally occurring carcinogens that require bioactivation**



**Griseofulvin** (produced by *Penicillium griseofulvum*)

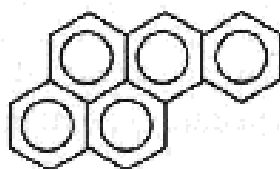


**Saffrole** (from sassafras)

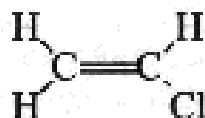


**N-methyl-N-formylhydrazine** (from edible false morel mushroom)

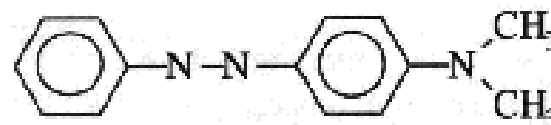
**Synthetic carcinogens that require bioactivation**



**Benzo(a)pyrene**

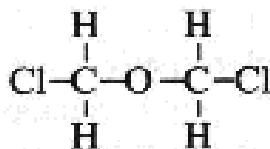


**Vinyl chloride**

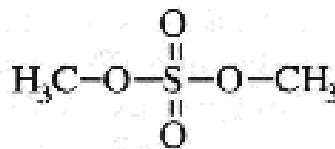


**4-dimethylaminoazobenzene**

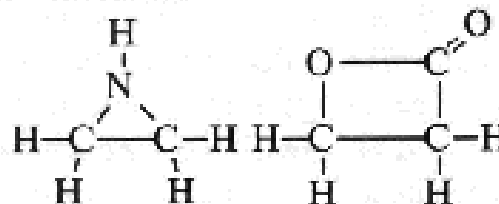
**Primary carcinogens that do not require bioactivation**



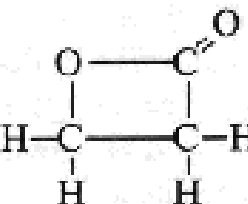
**Bis(chloromethyl)-ether**



**Dimethyl sulfate**



**Ethyleneimine**



**β-Propioacetone**

**Figure 7.17** Examples of the major classes of naturally occurring and synthetic carcinogens, some of which require bioactivation and others of which act directly.

# Cancerogeni epigenetici

promotori - agiscono dopo la fase di iniziazione (es. aumentano il numero di cellule tumorali - diminuiscono il tempo di latenza)

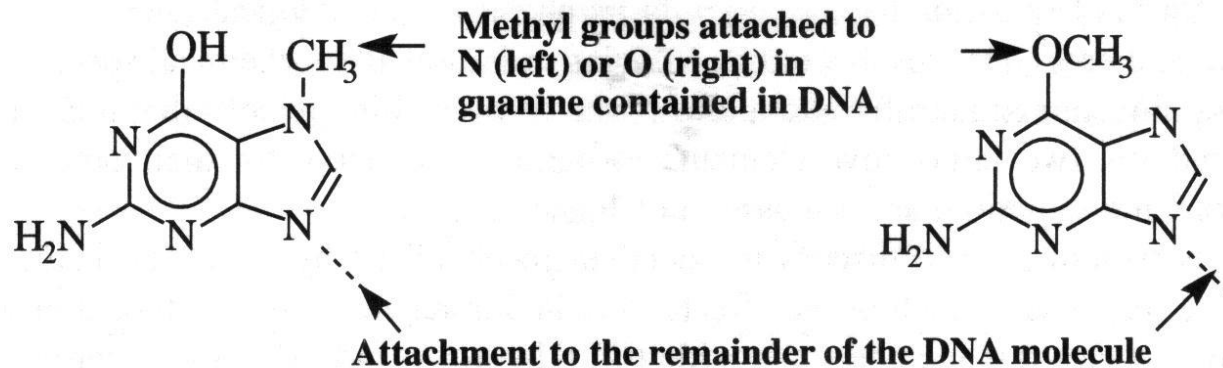
non iniziano la cancerogenesi / non sono elettrofili / non si legano al DNA

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3765050/>

*Wiki: L'epigenetica è una branca degli studi genetici che si occupa dei cambiamenti che influenzano il fenotipo senza alterare il genotipo. Studia tutte le modificazioni ereditabili che variano l'espressione genica pur non alterando la sequenza del DNA (soprattutto con riferimento ai fenomeni ereditari a livello cellulare, meno a quelli trans-generazionali, dal genitore al figlio). Si tratta, quindi, di fenomeni ereditari in cui il fenotipo è determinato non tanto dal genotipo ereditato in sé, quanto dalla sovrapposizione al genotipo stesso di "un'impronta" che ne influenza il comportamento funzionale.*

## Agenti alchilanti nella cancerogenesi

cancerogeni possono formare legami covalenti con proteine, peptidi, RNA e DNA. Sono gli addotti con il DNA ad essere significativi nell'iniziare la cancerogenesi.



8 Alkylated (methylated) forms of the nitrogenous base guanine.

Agenti alchilanti (inseriscono gruppi metilici o etilici) o arilanti (fenili) per il DNA. Spesso si formano metabolicamente (es. dimetil nitrosammina)

## Test sulla cancerogenicità

- studi epidemiologici
- test su animali, risultati estrapolati a esseri umani
- per screening: Ames test (mutagenicità - batteri di un ceppo di Salmonella, mutato geneticamente in modo che non sintetizzi l'aminoacido essenziale istidina, esposti a specie da testare; *se* si ha ritorno a specie originaria/naturale che sintetizza istidina *allora* in ambiente privo di i. verifico crescita di Salmonelle, *allora* la specie testata è mutagena)

# **Tossicologia – tossificazione e detossificazione**

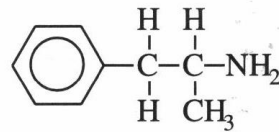
Composto genitore attivo

Metabolita attivo.

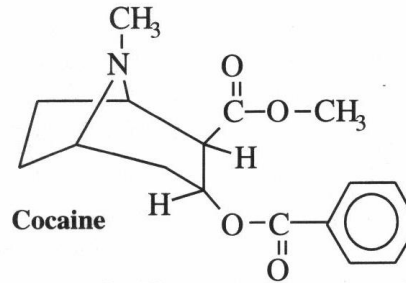
Effetti additivi / sinergici / di potenziamento /

Effetti antagonisti / “blockers” (competizione per un sito)

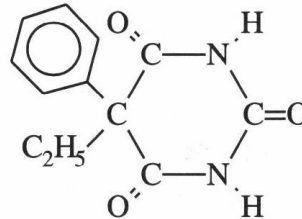
# Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



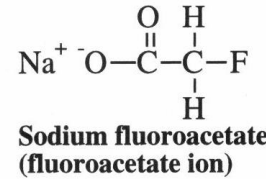
**Amphetamine  
(benzedrine)**



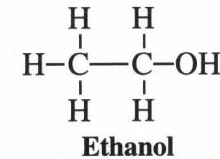
**Cocaine**



**Phenobarbital  
(a barbiturate)**

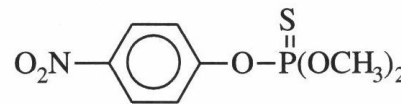


**Sodium fluoroacetate  
(fluoroacetate ion)**

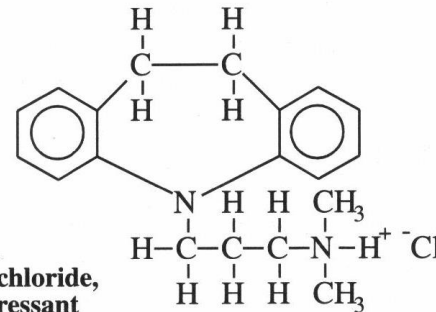


**Ethanol**

Examples of toxicants that affect body temperature. Amphetamine, cocaine, and fluoroacetate increase body temperature; phenobarbital and ethanol decrease it.



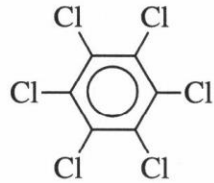
**Methyl parathion**



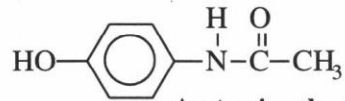
**Imiprimine hydrochloride,  
a tricyclic antidepressant**

Structures of toxicants that can affect pulse rate. Methyl parathion, a commonly used plant insecticide, can cause bradycardia. Imiprimine hydrochloride, a tricyclic antidepressant, can cause either tachycardia or arrhythmia.

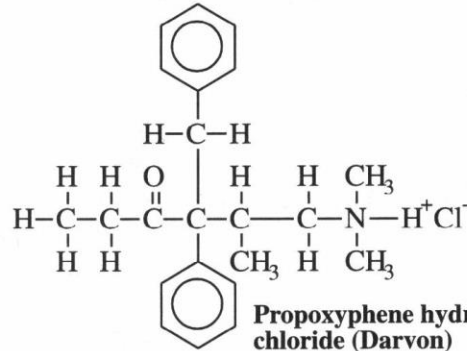
# Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



**Hexachlorobenzene**

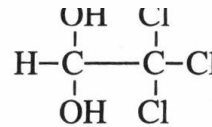


**Acetaminophen**

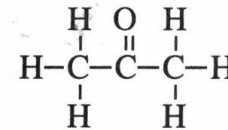


**Propoxyphene hydrochloride (Darvon)**

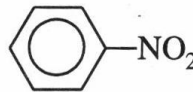
Some compounds that affect respiratory rate. Acetaminophen is one of the simple analgesics, which in therapeutic doses relieves pain without any effect on an individual's consciousness. Propoxyphene hydrochloride is a narcotic analgesic, a class of substances that can cause biochemical changes in the body leading to chemical dependency.



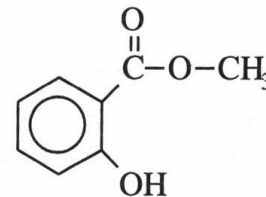
**Chloral hydrate  
(pear odor)**



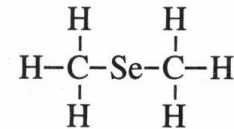
**Acetone  
(acetone odor)**



**Nitrobenzene  
(shoe polish)**



**Methyl salicylate  
(wintergreen)**



**Dimethyl selenide  
(garlic)**

Some toxicants and the odors they produce in exposed subjects.

# **Tossicologia – effetti riproduttivi e sullo sviluppo**

Effetti tossici sullo sviluppo

Effetti teratogeni (talidomide) (primo trimestre di gravidanza)

Effetti sul sistema riproduttivo

Effetti mutageni (alterazione del DNA)