

Valutazione del rischio chimico

CdL Magistrale Interateneo in
Analisi e Gestione Ambientale
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)

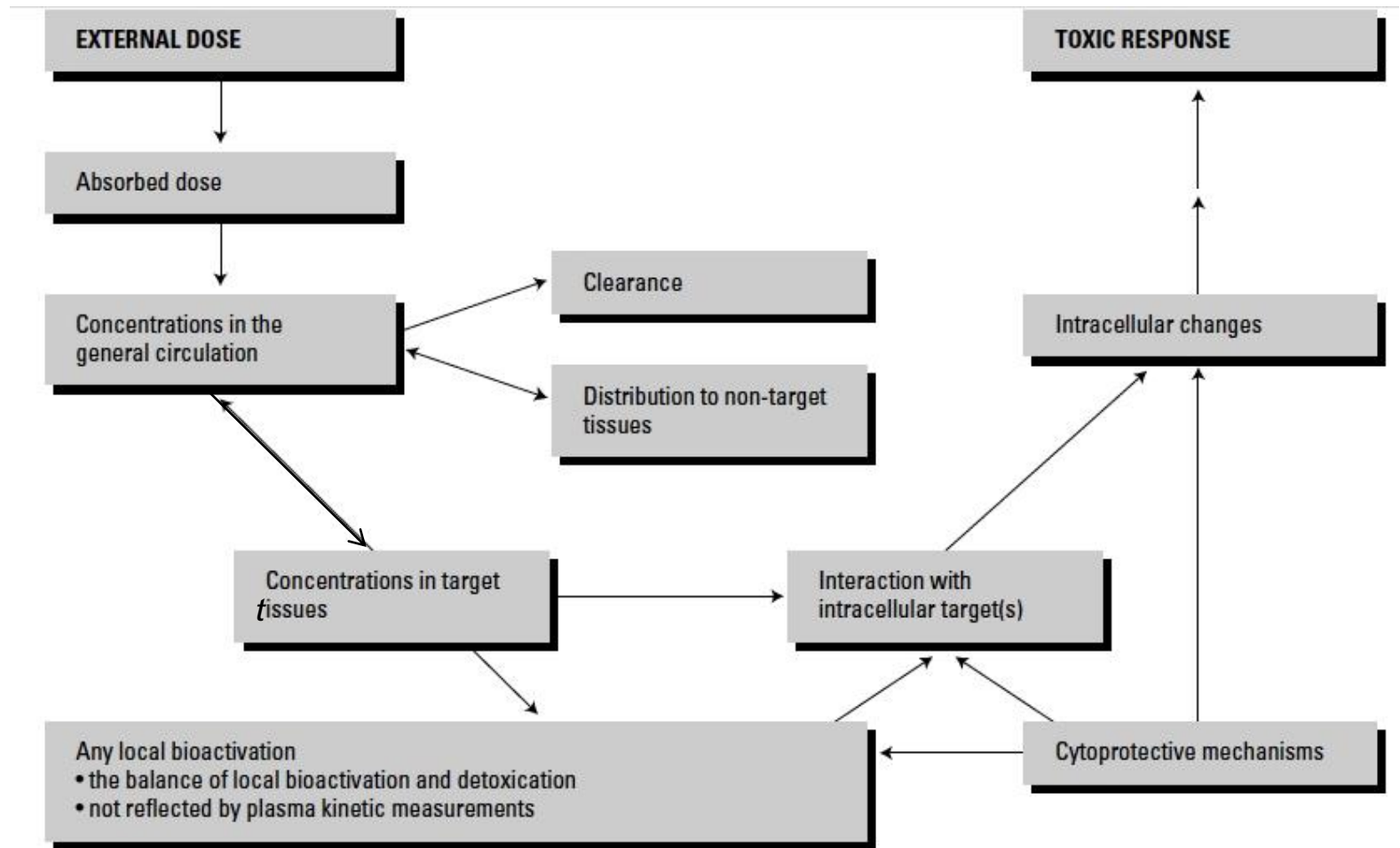
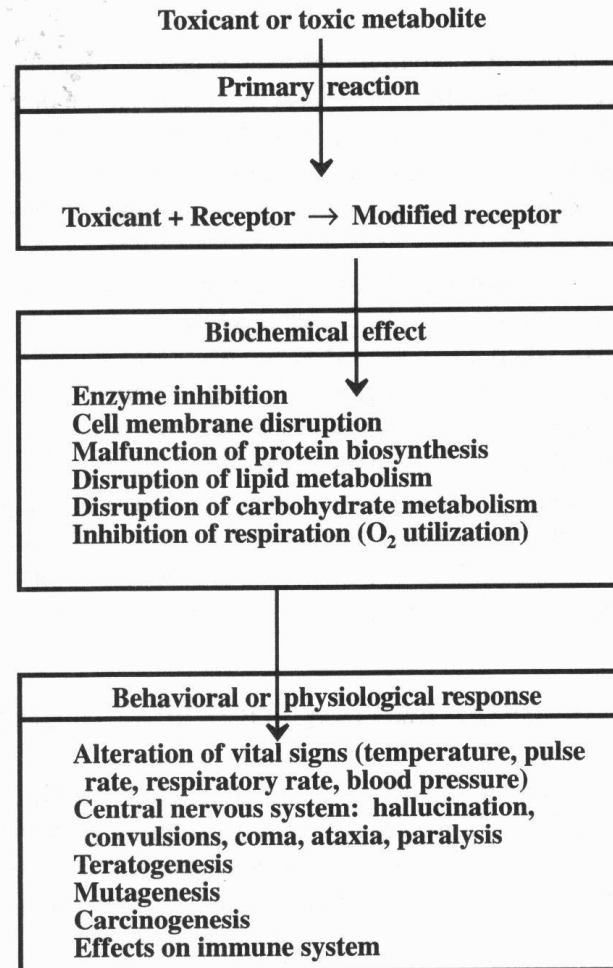


Figure 6.1. Processes leading to the generation of a toxic response [2].

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

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.

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)

Genotossicità

Genotoxicity refers to potentially harmful effects on genetic material. It ***includes mutagenicity*** which can be defined as the induction of permanent transmissible changes in the amount or structure of the genetic material.

Genotoxicity tests also provide indications of **other DNA damage** through unscheduled DNA synthesis, sister chromatid exchange (*scambio di porzioni omologhe di DNA tra i due cromatidi costituenti un cromosoma*), strandbreaks, adduct formation, mitotic recombination and Numerical chromosome aberrations (aneuploidy - *variazione nel numero dei cromosomi, rispetto a quello che normalmente caratterizza le cellule di un individuo*).

Genotoxicity testing is very useful in **pre-screening for potential genotoxic carcinogenicity**

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.

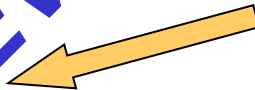
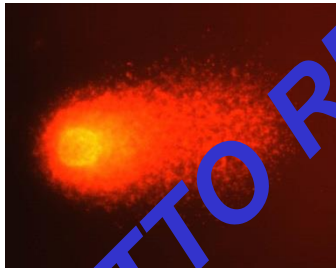
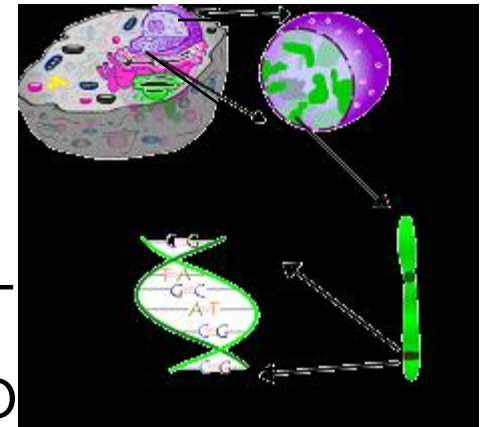
Va eseguito insieme a test su cellule eucariotiche (test dei micronuclei, test della cometa, quantificazione degli addotti al DNA) e su animali in vivo. Vi è comunque una buona correlazione fra l'effetto mutageno riscontrato nel test di Ames e la cancerogeneità della sostanza

Test della Cometa (SCGE)

PRINCIPIO



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



OSSERVAZIONE AL
MICROSCOPIO A
FLUORESCENZA

EFFETTO REVERSIBILE

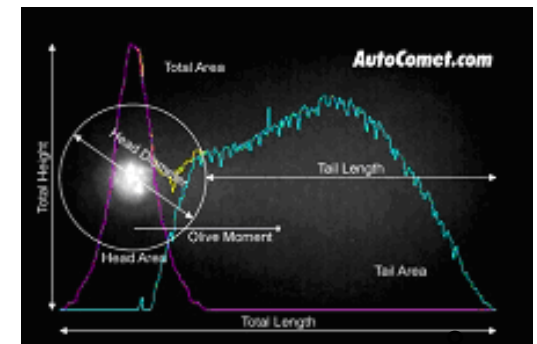


Table 5.7. Carcinogenicity studies

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"> - body weight, food consumption and water consumption at various intervals (see Table 5.6) - clinical examination at intervals (see Table 5.6) of 10 to 20 animals per sex per group - gross examination: daily observation and extensive gross examination on termination - histopathological examination in full of highest dose and controls where indicated, for other dose levels
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"> - libido - behaviour - endocrine function - mating - gamete production - reproductive life span
<i>Maternal toxicity</i> (changing physiology and metabolism during pregnancy and lactation)	<ul style="list-style-type: none"> - susceptibility - ability to nurse - milk quality/quantity
<i>Developmental toxicity</i> Pre-implantation and implantation	<ul style="list-style-type: none"> - fertilization - movement of fertilized ova - implantation - survival of ova
Embryonic development	<ul style="list-style-type: none"> - growth and differentiation - organ development - survival
Placental development	<ul style="list-style-type: none"> - growth - organ function
Foetal development	<ul style="list-style-type: none"> - growth and differentiation - organ function - survival
Postnatal development (neonatal, pre-weaning, post-weaning, puberty)	<ul style="list-style-type: none"> - birth weight - organ function - hormone function - immune function - CNS and peripheral NS function - sexual function - other cellular functions (transplacental carcinogenesis) - survival

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

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 esser spesso molto reattive

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

-> se prodotte metabolicamente, posson trovarsi in un sito in cui interagire facilmente con le biomeolecole, 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 (es. CO metabolico formato da dealogenazione ed ossidazione di alometani -> lega con Fe^{2+} di emoglobina, impedisce trasporto O_2 ; CN^- prodotto da metabolismo di acrilonitrile -> lega con 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 $\text{O}_2^{\cdot-}$; 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 $\text{Cl}_3\text{C}^{\cdot}$ (terribile!).
- 4) Reagenti redox:** possono far decorrere reazioni di ossido-riduzione pericolose (es. $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow$ ossidazione di Fe^{2+} a Fe^{3+} (metemoglobinemia))

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.

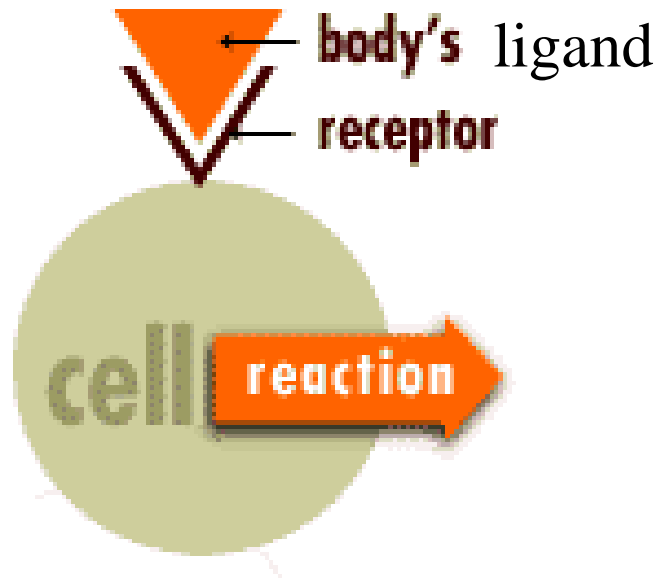
In genere i r. sono macromolecole (come proteine, acidi nucleici o fosfolipidi di membrane cellulari) interne alle o sulla superficie delle cellule.

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*)

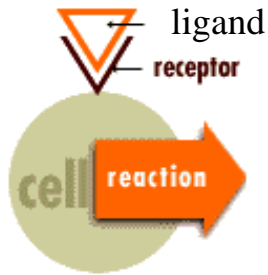
Si noti che reazioni tra r. e tossico sono spesso 100 x più forti di quelle tra enzimi e substrati.

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

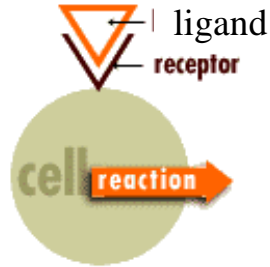
In molti casi l'identità del recettore NON è nota (es. insetticidi piretroidi). In tal caso, per il tossico X, ci si riferisce al recettore X.

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

excessive



insufficient

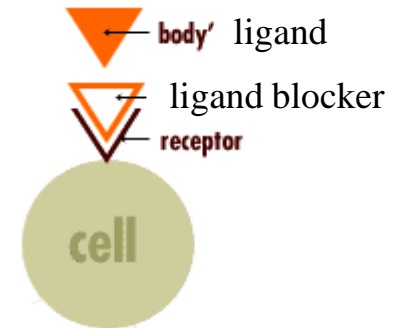


Azione diversa in grado
(effetti avversi)

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.

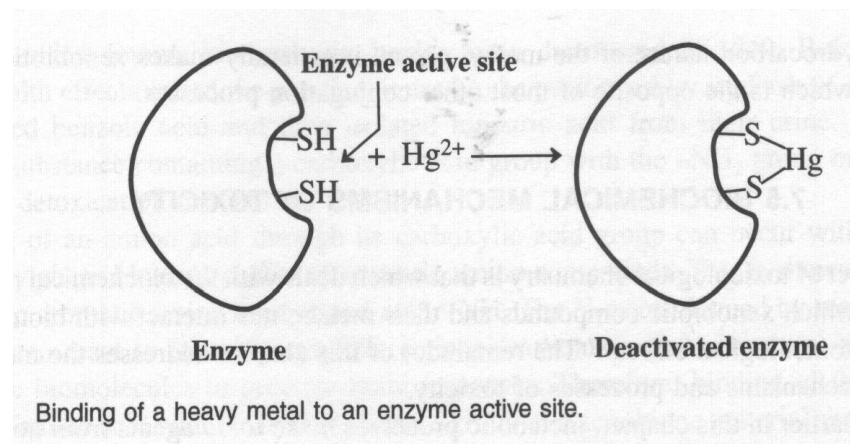
Xenobiotici a volte sono **inibitori di enzimi** che rallentano o bloccano gli e. dall'effettuare la loro normale funzione di catalizzatori biochimici.

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..

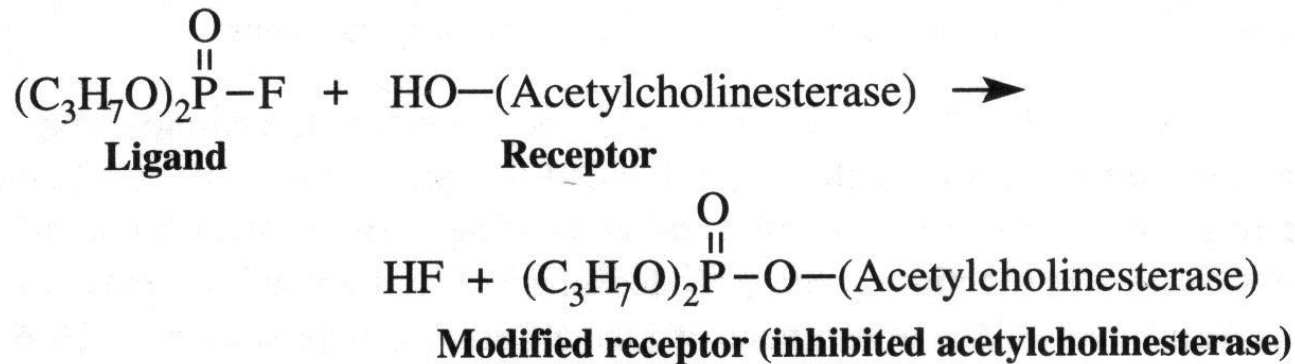
Esempio di inibizione dovuta a specie tossiche:

ioni di metalli pesanti Hg^{2+} , Cd^{2+} , 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.



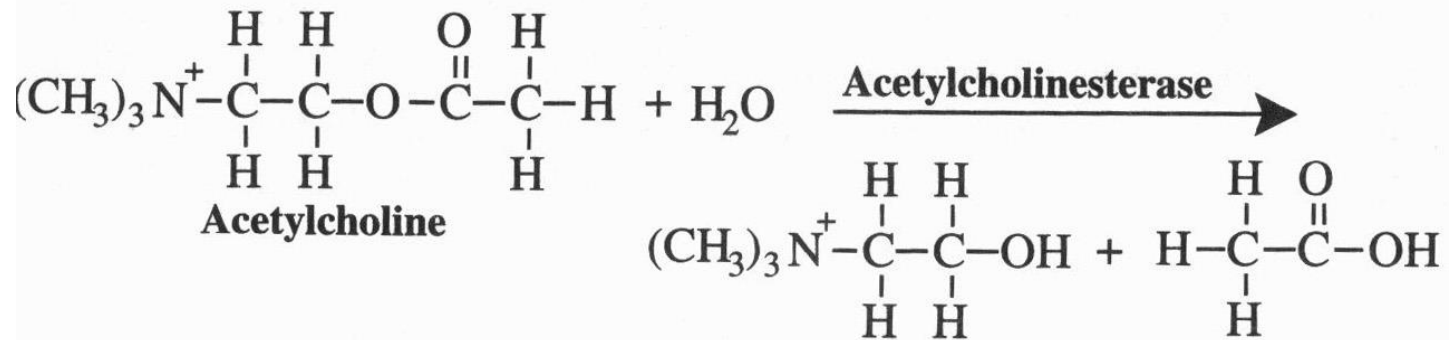
Inibizione di metalloenzimi (e. che contengono un metallo nella loro struttura) avviene spesso per sostituzione del metallo con un m. xenobiotico (es. Cd^{2+} sostituisce Zn^{2+} in ATPasi, alcol deidrogenasi)

Inibizione dovuta a composti organici che formano legami covalenti

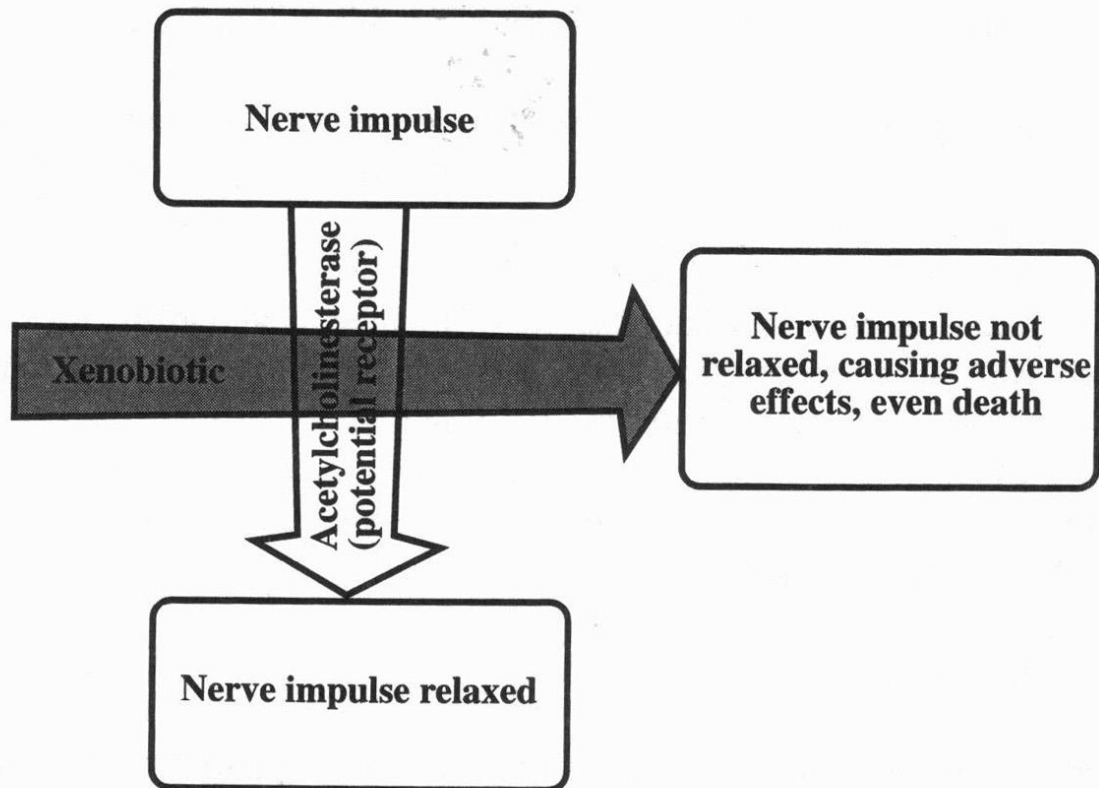


-> Effetti tossici su sistema nervoso
(il legante è un gas nervino - diisopropilfosfofluoridato)

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

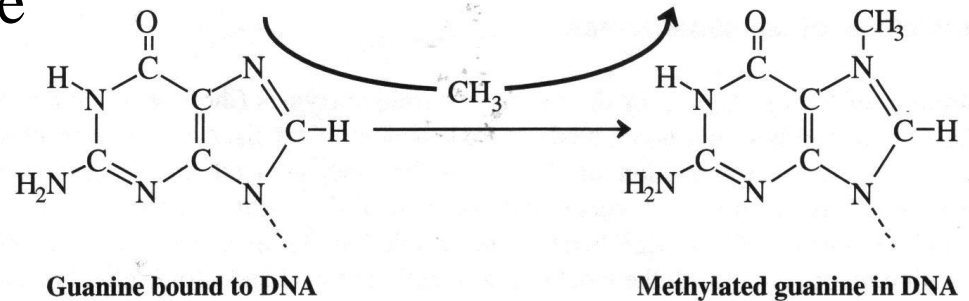


Figure 7.14 Alkylation of guanine in DNA.

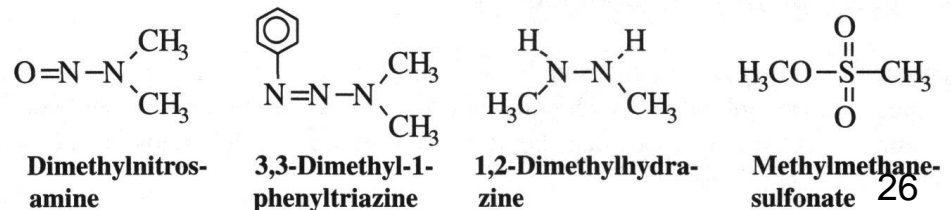
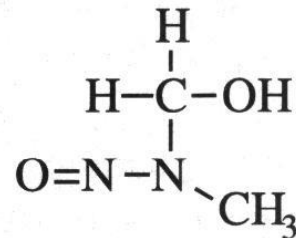
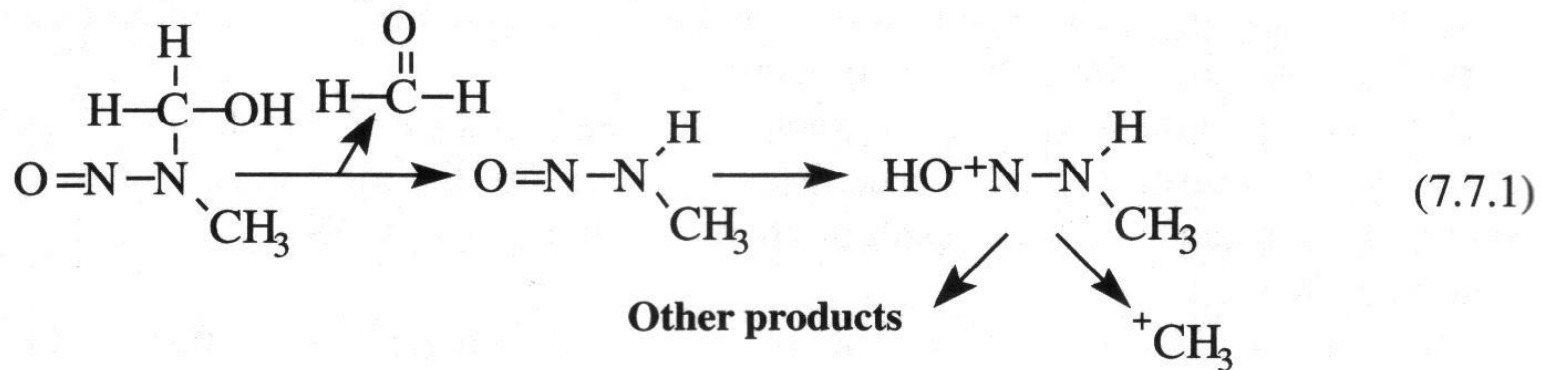


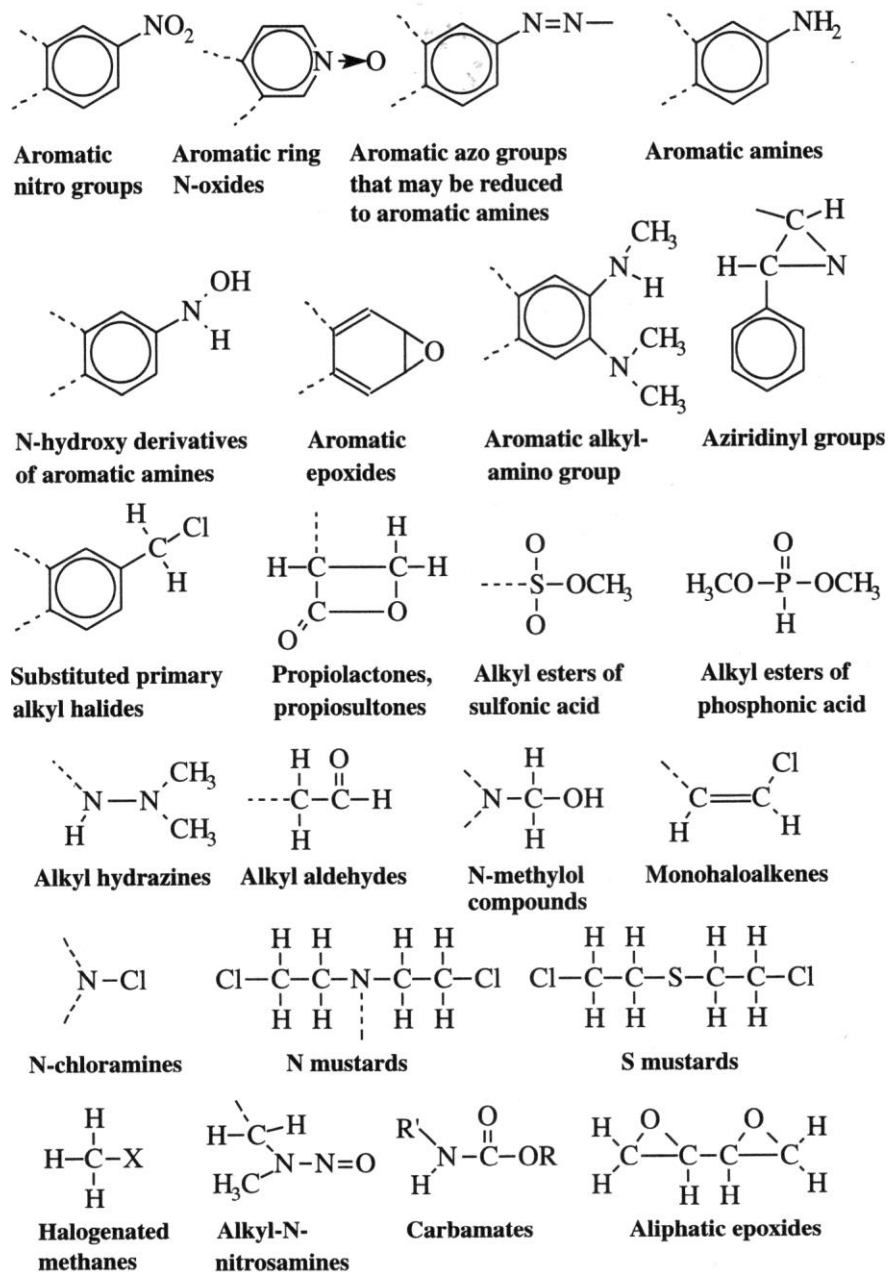
Figure 7.15 Examples of simple alkylating agents capable of causing mutations.

Es. Dimetil nitrosamina è attivata dal NADPH generando intermedio reattivo



This product undergoes several nonenzymatic transitions, losing formaldehyde and generating a carbonium ion, $^+\text{CH}_3$, that can methylate nitrogenous bases on DNA:





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)

Due passaggi principali nella cancerogenesi chimica:

iniziazione e promozione

Neoplastic conversion

Chemical carcinogen

Metabolic
activation

Ultimate carcinogen

+DNA

Altered receptor

Expression

Neoplastic development and progression

Latent tumour cell

Growth
promotion

Differentiated tumour

Progression

Undifferentiated cancer

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

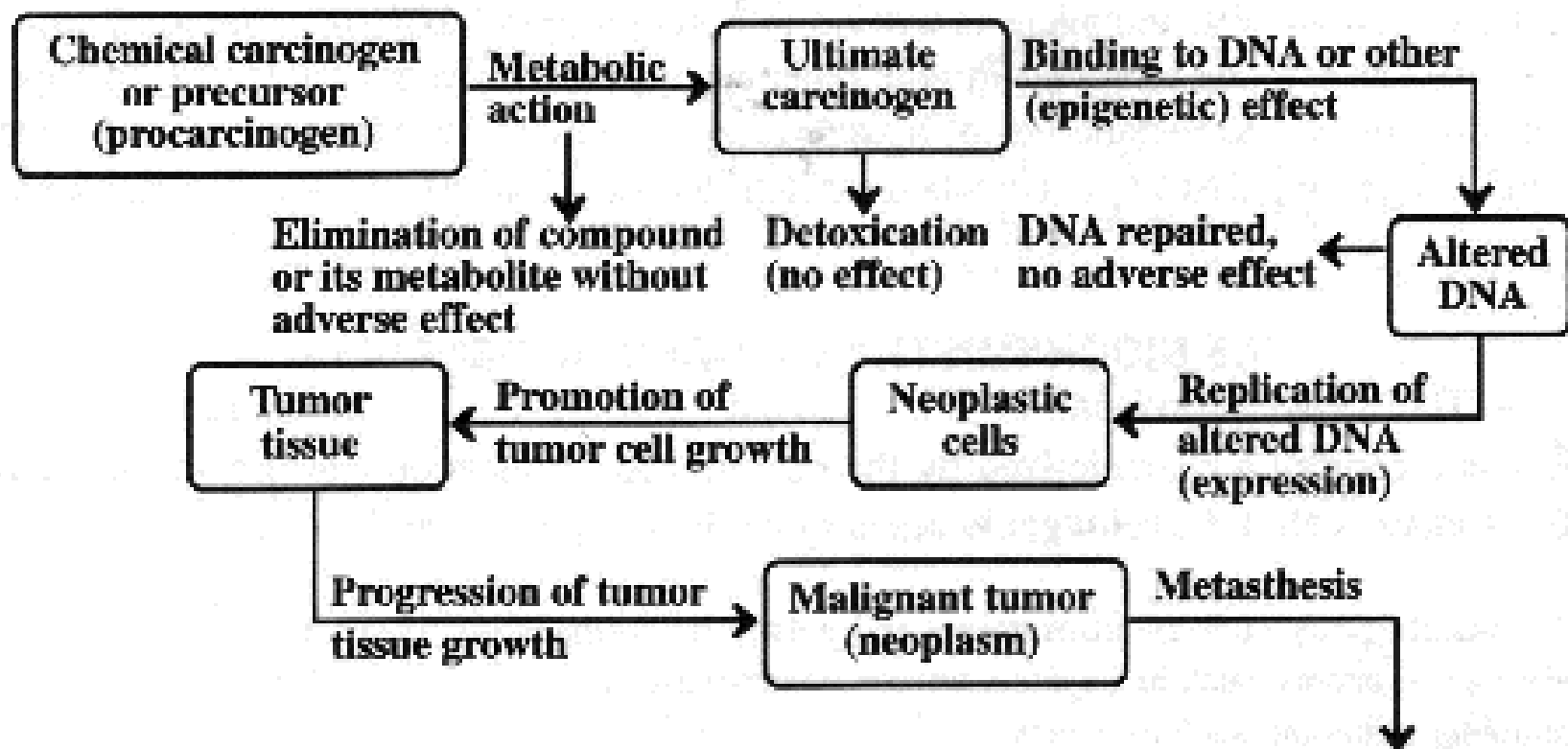
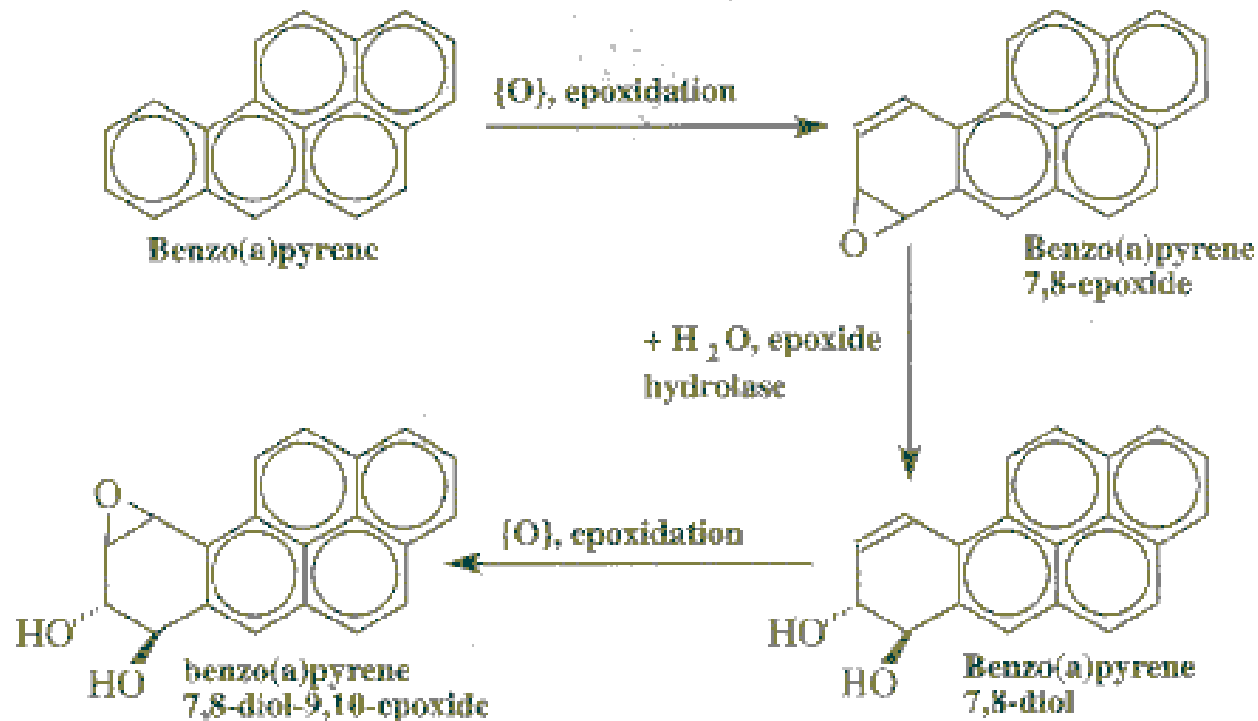


Figure 7.16 Outline of the carcinogenic process.

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

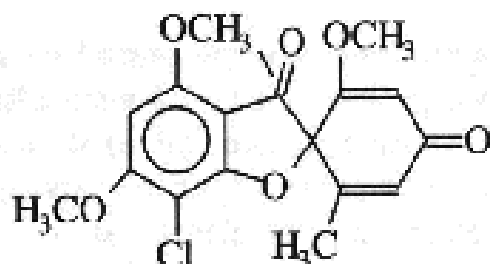
idratazione degli epossidi

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

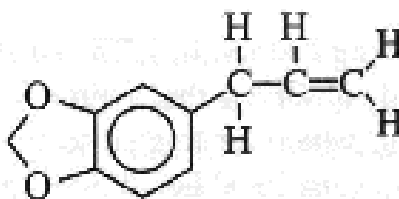


- 3 Epoxidation and hydroxylation of benzo(a)pyrene (left) to form carcinogenic benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide.

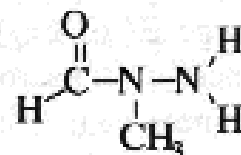
Naturally occurring carcinogens that require bioactivation



Griseofulvin (produced by *Penicillium griseofulvum*)

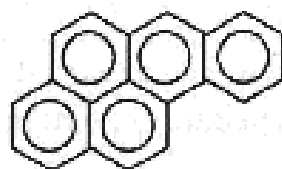


Saffrole (from sassafras)

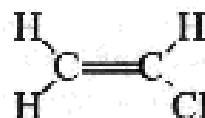


N-methyl-N-formylhydrazine (from edible false morel mushroom)

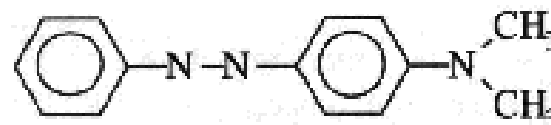
Synthetic carcinogens that require bioactivation



Benzo(a)pyrene

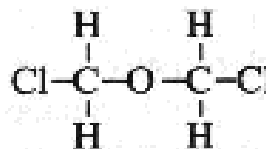


Vinyl chloride

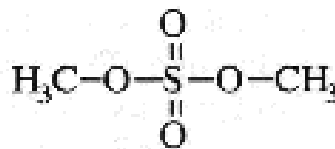


4-dimethylaminoazobenzene

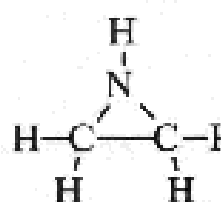
Primary carcinogens that do not require bioactivation



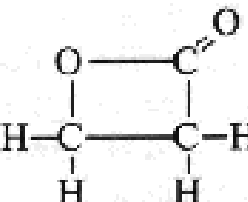
Bis(chloromethyl)-ether



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.

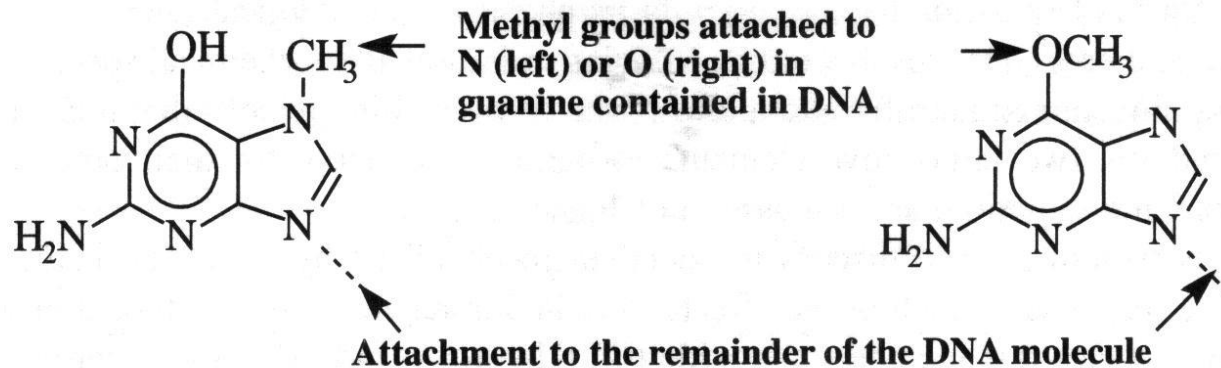
Cancerogeni epigenetici

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

Agenti alchilanti nella cancerogenesi

cancerogeni posson formare legami covalenti con proteine, peptidi, RNA e DNA. Sono gli addotti con il DNA ad esser 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

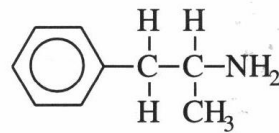
Composto genitore attivo

Metabolita attivo.

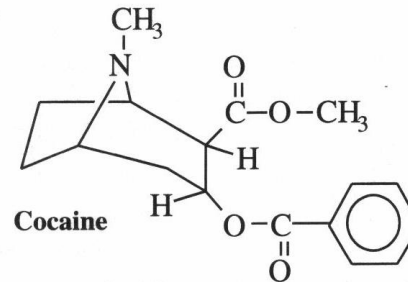
Effetti additivi / sinergici / di potenziamento /

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

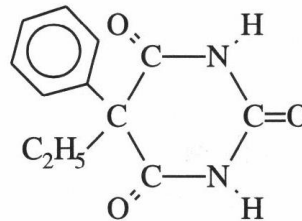
Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



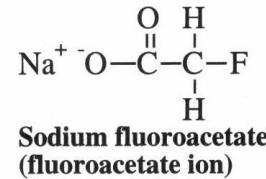
**Amphetamine
(benzedrine)**



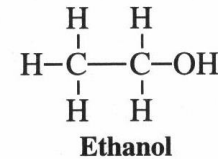
Cocaine



**Phenobarbital
(a barbiturate)**

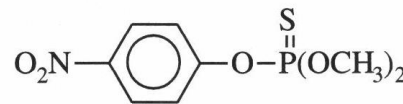


**Sodium fluoroacetate
(fluoroacetate ion)**

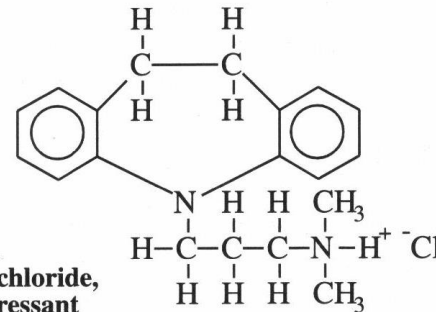


Ethanol

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



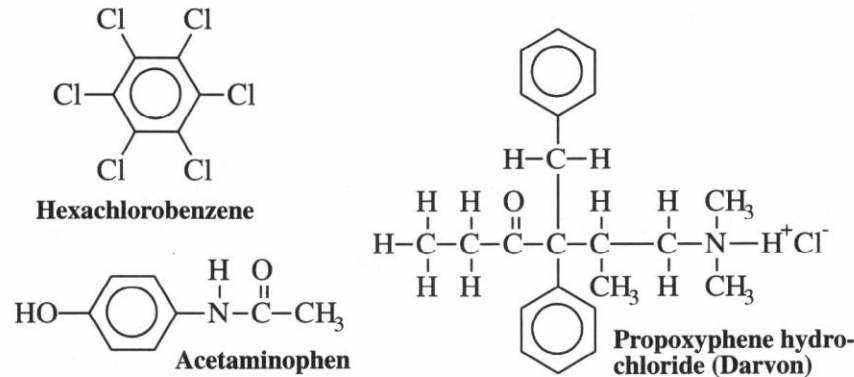
Methyl parathion



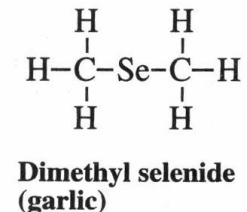
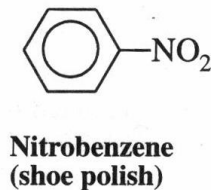
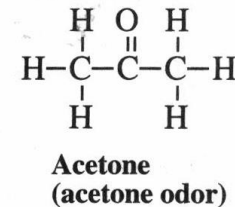
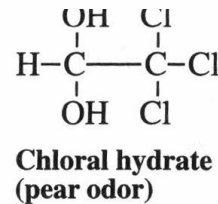
**Imipramine hydrochloride,
a tricyclic antidepressant**

Structures of toxicants that can affect pulse rate. Methyl parathion, a commonly used plant insecticide, can cause bradycardia. Imipramine 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.



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)

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)

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 ^a
Examinations	<ul style="list-style-type: none">- clinical examination for signs of toxicity or death- gross examination- histopathological examination if indicated
Results	the LD50 or LC50 value for each sex at 95% confidence interval

^a If a dose of 2000 mg/kg_{bw} 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 _{bw}	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 _{bw}	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 _{bw}	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 _{bw}	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

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 ^a
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"> - body weight, food consumption and water consumption - 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 - gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy - organ weights - histopathological examination: of all preserved organs and tissues (30 or more) of highest dose and control. If indicated, intermediate and low dose groups
Results	information concerning effects of repeated dose exposure for parameters measured, target organ(s); if possible, mechanism of action and NOAEL

^a 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"> - 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) - clinical examination: haematological and biochemical examination and urine analysis (Table 5.5) at onset of study and at 6 month intervals - gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy - organ weights - histopathological examination in full of all preserved organs and tissues of highest dose and controls. If indicated, of intermediate and lowest dose
Results	information concerning effects of repeated dose exposure on parameters studied, target organ(s); if possible, mechanism of toxicity and NOAEL

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"> - body weight, food consumption and water consumption at various intervals (see Table 5.6) - clinical examination at intervals (see Table 5.6) of 10 to 20 animals per sex per group - gross examination: daily observation and extensive gross examination on termination - histopathological examination in full of highest dose and controls where indicated, for other dose levels
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"> - libido - behaviour - endocrine function - mating - gamete production - reproductive life span
<i>Maternal toxicity</i> (changing physiology and metabolism during pregnancy and lactation)	<ul style="list-style-type: none"> - susceptibility - ability to nurse - milk quality/quantity
<i>Developmental toxicity</i> Pre-implantation and implantation	<ul style="list-style-type: none"> - fertilization - movement of fertilized ova - implantation - survival of ova
Embryonic development	<ul style="list-style-type: none"> - growth and differentiation - organ development - survival
Placental development	<ul style="list-style-type: none"> - growth - organ function
Foetal development	<ul style="list-style-type: none"> - growth and differentiation - organ function - survival
Postnatal development (neonatal, pre-weaning, post-weaning, puberty)	<ul style="list-style-type: none"> - birth weight - organ function - hormone function - immune function - CNS and peripheral NS function - sexual function - other cellular functions (transplacental carcinogenesis) - survival

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

Table 5.11. Estimated conversion factors between an LD50, the NOEL of a subchronic or chronic study and the acceptable daily intake (ADI)

LD50	NOEL subchronic	NOEL chronic	ADI
100,000 - 5,000,000	300 - 1000	100	1

Table 5.12. Actual intake and safety margin for a number of substances, adapted after Kroes and Feron [59]

Substances		Actual daily intake	Safety margin
Fat	(en %) ^a	40	<2
Sugar	(g)	100	2-3
Nicotin acid	(mg)	20 ^b	50
Vitamin A	(IE)	5000 ^b	18
Selenium	(mg)	1 ^b	10
Tocoferol	(mg)	0.15-2	60-6
Vitamin D	(IE)	400 ^b	5
Fluor	(mg)	1 ^b	5
NaCl	(g)	9	<2
Mercury	(μg)	63	50
Sulphite	(mg)	3	1400
Bromide	(mg)	9.4	10
Solanin	(mg)	1	2
Dietary fibre	(g)	20-30 ^a	2
Aspertame	(mg)	300	800
DDT	(μg)	6	5000
Dieldrin	(μg)	0.5	1200
Lindane	(μg)	2	30000
Dioxins	(pg)	135	500

^a Energy percents.

^b Recommended daily intake.