

18° Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia Bologna, 10-13 aprile 2018 - Savoia Hotel Regency

Indice dei simposi:

Editoriale

Sarah Vecchio..... pag. 2

Lo stato dell'arte in tema di intossicazioni da veleni animali e biotossine

- Loxoscelismo: entità rara ma temibile
A. Ieri..... pag. 2
- Neurotossicità del veleno di vipera
D. Lonati pag. 3

Farmaci orfani per terapie rare: quali sfide per il tossicologo

- Sviluppo pre-clinico di oligonucleotidi
R. Tonelli, L. Montemurro, S. Angelucci, D. Bartolucci, C. Amadesi, M. Pecoraro, M. Lauriola, L. Falcioni, G. Nieddu, L. Cerisoli, A. Pession, P. Hrelia, A. L. Scardovi..... pag. 4
- Trial preclinici di prodotti biotecnologici e il giusto "bridging" verso gli studi clinici
I. Andreini..... pag. 5
- Terapie cellulari: sfide nella ricerca e nello sviluppo preclinico
C. Bernardi, G. Di Gallo pag. 6
- La sfida di nuovi percorsi di regolamentazione per non ostacolare l'innovazione in campo farmaceutico
A. Meneguz..... pag. 6
- La ricerca clinica nelle malattie rare: implicazioni metodologiche e ruolo della farmacovigilanza
M. Morina, J. Angelini, A. Chiarenz, A. Coscarella, M. Scatigna..... pag. 7

Problematiche tossicologiche riproduttive

- Uso dei farmaci antinfiammatori ed immunosoppressori in gravidanza
M. De Santis, C. De Luca..... pag. 8
- Rischio embrio-fetale da farmaci antiepilettici
A. Pistelli..... pag. 8
- Aspetti clinici dei disordini dello spettro alcolico fetale (FASD) nel bambino
L. Tarani..... pag. 9
- Abuso di sostanze e farmacoterapia in allattamento
M. Gallo, G. Bacis..... pag. 14

Contaminanti di processo

- Valutazione del rischio per la presenza di acrilamide e furani negli alimenti
L. Ramos Bordajandi..... pag. 15
- TTC: un approccio metodologico per contaminanti sconosciuti
C. L. Galli..... pag. 16

- Valutazione del rischio per i contaminanti di processo presenti negli oli vegetali raffinati
M. Binaglia..... pag. 16

- Effetti di salute del consumo di caffè: i dati epidemiologici
A. Poli..... pag. 17

Dal fitocomplesso all'integratore alimentare: qualità, efficacia e rischi per la salute

- I fitochimici tra evidenze precliniche ed efficacia clinica: l'esempio della quercetina
G. L. Russo pag. 17
- L'efficacia clinica dei prodotti a base di piante medicinali: generalità e dati recenti
A. A. Izzo..... pag. 18
- Tollerabilità e sicurezza di impiego dei nutraceutici ipocolesterolemizzanti
A. F. G. Cicero..... pag. 19
- Fitovigilanza e aspetti di sicurezza di fitoterapici e integratori alimentari
A. Vannacci pag. 20

Effetti indesiderati dei farmaci: dalla tossicologia pre-clinica alla farmacovigilanza

- Verso la connessione tra evidenza pre-clinica e paziente
G. Dal Negro pag. 21
- La tossicologia post-marketing: identificazione dei nuovi effetti indesiderati dei farmaci nella pratica clinica quotidiana
D. Motola pag. 21
- Farmacovigilanza: il ruolo del Centro Antiveneni
S. Vecchio..... pag. 22
- Farmacovigilanza: quali le sfide future per l'azienda farmaceutica?
L. Stagi..... pag. 22

Monitoraggio biologico negli ambienti di vita e di lavoro: sfide e prospettive future

- Monitoraggio biologico dell'esposizione occupazionale ed ambientale ad elementi metallici quale strumento di valutazione del rischio per la salute
P. Lovreglio..... pag. 23
- Aggiornamenti in tema di monitoraggio biologico dei solventi
S. Fustinoni..... pag. 24
- Valutazione del rischio da nanomateriali: possibile uso del monitoraggio biologico nella valutazione dell'esposizione
I. Iavicoli, V. Leso..... pag. 25
- Indicatori urinari di danno ossidativo agli acidi nucleici
R. Andreoli..... pag. 26
- L'esposoma: linea di ricerca obbligata nelle Scienze Mediche Occupazionali e Ambientali
G. De Palma, M. Paganelli, P. Apostoli pag. 26

Editoriale

Sarah Vecchio

Cari soci,
con questo numero si conclude la serie di SITOX Informa dedicata alla pubblicazione dei contributi relativi ai corsi ed ai simposi organizzati in occasione del 18° Congresso Nazionale SITOX (Savoia Hotel Regency, Bologna, 10-13 aprile 2018). Gli stessi sono disponibili anche on line sul sito web www.sitox.org. I temi affrontati in questo numero riguardano intossicazioni da veleni animali e biotossine, farmaci orfani per terapie rare, problematiche tossicologiche riproduttive, contaminanti di processo, fitocomplessi e integratori alimentari, effetti indesiderati dei farmaci e farmacovigilanza e monitoraggio biologico negli ambienti di vita e di lavoro. Temi quindi numerosi, attuali e diversificati, come da tradizione SITOX. Abbiamo voluto dedicare questo spazio alla pubblicazione dei vostri lavori come forma di ringraziamento per la partecipazione alle attività della società e per sottolineare quanto siano importanti per SITOX la presenza attiva ed il sostegno di ogni socio, consapevoli come sempre che l'eterogeneità del mondo tossicologico costituisce la nostra forza e la nostra ricchezza. L'anno prossimo ci aspettano novità importanti e stimolanti, di cui inizieremo a parlare dal prossimo numero. Nel frattempo SITOX continua ad essere attiva sui canali social Facebook e Twitter. Adesso auguro quindi a tutti voi, unitamente al Comitato Editoriale e al Consiglio Direttivo SITOX, i migliori auguri di buone feste.

Lo stato dell'arte in tema di intossicazioni da veleni animali e biotossine

(Giorno 12 aprile 2018, 10.30-12.00)

Loxoscelismo: entità rara ma temibile

Alessandra Ieri

SODc Tossicologia Medica, CAV, AOU Careggi, Firenze

Il *Loxosceles rufescens* è uno dei ragni presenti nel bacino mediterraneo potenzialmente pericolosi per la salute umana. La sua progressiva sinantropizzazione lo rende facilmente osservabile nelle abitazioni, soprattutto nelle ore notturne e nei mesi più caldi. Il veleno contiene tossine ad azione emolitico-necrotica responsabili di caratteristiche lesioni dermo-necrotiche talora di rilevante entità e di difficile trattamento. Più raramente si possono manifestare sintomi sistemici (loxoscelismo viscerocutaneo) quali astenia, febbre, malessere generale, eruzione morbilliforme, fino a forme più gravi con emolisi, ittero, rhabdomiolisi e CID. In Italia i casi di loxoscelismo sistemico sono rari.

In questo lavoro sono stati valutati 111 casi di presunto morso di ragno che sono giunti alla nostra attenzione dal 2013 al 2017 (consulenze CAV e visite ambulatoriali), individuando quelli suggestivi di loxoscelismo. La casistica osservata è stata stratificata per età, sesso, identificazione del ragno ed insorgenza della sintomatologia dolorosa. Abbiamo inoltre valutato il tipo di lesione, caratterizzata dalla tipica evoluzione: eritema, lesione bollosa, ischemia, necrosi. L'eventuale presenza di sintomi sistemici come l'eritema generalizzato di tipo morbilliforme, la febbre, la linfoadenite, la linfoadenopatia, i dolori articolari o muscolari, è stata attentamente monitorizzata fino alla risoluzione clinica. La diagnosi nella maggioranza dei casi

è solo presuntiva, poiché il morso non è doloroso nell'immediato e non è comune la visualizzazione del ragno da parte del paziente. In mancanza dell'identificazione aracnologica la diagnosi si basa sul criterio epidemiologico, presenza del ragno nella zona geografica, anamnestico, dolore ad insorgenza tardiva, e clinico, decorso della lesione cutanea. La diagnosi differenziale con altre forme cliniche non è sempre facile e può comportare una tendenza ad una sopravvalutazione dei casi di aracnoidismo necrotico. Il trattamento prevede l'uso di antibiotici, cortisonici, antistaminici, eparina a basso peso molecolare, oltre al trattamento locale delle lesioni necrotiche [1].

Neurotossicità del veleno di vipera

Davide Lonati

Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, IRCCS Istituti Clinici Scientifici Maugeri, Pavia

L'avvelenamento da morso di vipera è caratterizzato da effetti clinici sia locali che sistemici. Gli effetti sistemici possono essere a carico del sistema gastroenterico, cardiocircolatorio e coagulatorio. In alcuni casi anche il sistema nervoso periferico può essere coinvolto.

In Italia, si elencano 4 specie di Vipera: (i) *Vipera ammodytes*, diffusa nel nord-est (Friuli Venezia Giulia, Trentino Alto Adige), (ii) *Vipera aspis*, diffusa in tutto il territorio italiano, escludendo la Sardegna, (iii) *Vipera berus*, presente sulle Alpi, e (iv) *Vipera ursinii* diffusa solo in alcune zone circoscritte del centro. La varietà delle specie presenti corrisponde alla variabilità del veleno e di conseguenza a potenziali differenti quadri clinici di avvelenamento. Tali variabili influenzano inoltre la risposta clinica al trattamento antidotico.

Il veleno di vipera è caratterizzato da una miscela di componenti tra cui proteasi, metallo-proteinasi, ialuronidasi, fosfolipasi e fattori inibitori/attivatori della coagulazione. Le principali neurotossine

riscontrate nel veleno di vipere europee sono PLA2 in grado di causare paralisi, influenzando sulla trasmissione neuromuscolare prevalentemente a livello pre-sinaptico; le PLA2 agiscono a livello periferico in quanto non in grado di attraversare la barriera emato-encefalica. Lo studio dei casi di avvelenamento da morso di vipera valutati in consulenza dal Centro Antiveneni di Pavia - Centro Nazionale di Informazione Tossicologica ha dimostrato che il 5% dei pazienti sviluppa neurotossicità. Tutti i casi hanno manifestato segni locali di avvelenamento: in più della metà dei casi il quadro è stato caratterizzato da edema esteso associato a necrosi tissutale. Per quanto riguarda invece la sintomatologia sistemica, il vomito, la diarrea e l'addominalgia sono stati riportati più frequentemente.

La sintomatologia neurologica è stata caratterizzata più frequentemente da disturbi dell'accomodazione, diplopia, ptosi e oftalmoplegia; più raramente si è osservato disfagia, disartria e dispnea. La neurotossicità è stata l'unica espressione di tossicità sistemica in circa il 35% dei casi. In generale, la sintomatologia neurologica compare successivamente alla risoluzione completa dei sintomi sistemici non-neurologici e spesso dopo 12 ore dall'inoculazione del veleno. In tutti i casi la sintomatologia neurologica è totalmente regredita ed ha coinvolto (finora) la muscolatura del distretto cranico. È verosimile che la comparsa delle manifestazioni neurologiche sia condizionata da molti fattori: la quantità di veleno inoculato, la concentrazione di componente neurotossica fosfolipasica (dipendente anche dalla specie coinvolta) e la risposta individuale.

La variabilità e il cambiamento nel tempo dei componenti del veleno dei serpenti sono oggetto di continuo studio e anche in Italia sono in corso studi per cercare di caratterizzare il veleno delle differenti specie di vipere. Tali aspetti sono rilevanti

[1] Boissiere F., Masson R., Fluieraru S., Vitse J., Dessena L., Lefevre M., Bekara F., Herlin C. *Le loxoscelisme cutané, à propos d'une observation exceptionnelle de 9 cas consécutifs.* Ann. Chir. Plast. Esthet., 61, 811-819, 2016.

per la valutazione clinica e per l'indicazione al trattamento antidotico con antisieri il più specie-specifici possibile.

Farmaci orfani per terapie rare: quali sfide per il tossicologo

(Giorno 12 aprile 2018, 14.00-16.00)

Sviluppo pre-clinico di oligonucleotidi

R. Tonelli¹, L. Montemurro², S. Angelucci¹,
D. Bartolucci¹, C. Amadesi³,
M. Pecoraro⁴, M. Lauriola⁵, L. Falcioni⁵,
G. Nieddu³, L. Cerisoli³, A. Pession², P. Hrelia¹,
A. L. Scardovi³

¹Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FaBit), Università di Bologna, Bologna, ²Centro Interdipartimentale per la Ricerca sul Cancro, Università di Bologna, Bologna, ³BIOGENER SpA, Bologna, ⁴Aptuit, Verona, Italia; ⁵GLP Life Test, Bologna

Gli oligonucleotidi rappresentano una classe emergente di farmaci con numerose potenziali applicazioni terapeutiche. La recente immissione sul mercato di nuovi farmaci oligonucleotidici non solo aumenta l'attenzione su questa promettente classe, ma sottolinea anche il bisogno di caratterizzare meglio il loro profilo di efficacia e sicurezza.

Verrà presentata una panoramica delle diverse generazioni di oligonucleotidi terapeutici con particolare attenzione alle modificazioni chimiche che sono state introdotte per ottimizzare i profili farmacologici e tossicologici.

Inoltre, verranno presentati come esempio gli studi preclinici di efficacia e sicurezza, relativi ad un oligonucleotide anti-MYCN a PNA (BGA002), che ha ottenuto la designazione di farmaco orfano per il trattamento del Neuroblastoma (NB) (da EMA ed FDA) e per il trattamento dei Sarcomi dei Tessuti Molli (da EMA).

Gli oligonucleotidi Acidi Peptido-Nucleici

(PNAs) appartengono alla più recente classe di terapie biotecnologiche basate su analoghi del DNA e possiedono caratteristiche del tutto uniche per il loro impiego in ambito clinico: resistenza alla degradazione, alta stabilità e alta specificità per le sequenze *target* complementari a DNA e RNA, capacità di legame alla sequenza *target* e conseguente blocco della trascrizione.

MYCN appartiene alla famiglia degli oncogeni MYC ed è correlato a molte caratteristiche tipiche dei tumori più aggressivi. MYCN è frequentemente espresso e/o amplificato in un rilevante numero di tumori solidi pediatrici tra i quali il Neuroblastoma, il Rhabdomyosarcoma, il Medulloblastoma ed anche in tumori dell'adulto quali il Tumore del Polmone a piccole cellule. MYCN è anche un marker di prognosi infausta per i tumori pediatrici e dell'adulto più aggressivi. MYCN è altamente espresso in epoca fetale e nelle masse tumorali, mentre presenta un *pattern* di espressione molto ristretto in tessuti sani dopo la nascita; di conseguenza non sono attesi effetti avversi a seguito di una terapia specifica anti-MYCN per Neuroblastomi con MYCN amplificato/espresso. È stata dimostrata efficacia sia in esperimenti *in-vitro* che *in-vivo*, questi ultimi condotti su tre diversi modelli murini tumorali. Sono stati completati in topi juvenile gli studi di tossicologia e di sicurezza in conformità alle BPL. Altri studi (valutazione cardiovascolare in coniglio e test dei canali hERG) sono stati condotti per integrare i dati di sicurezza farmacologica. Le valutazioni di sicurezza farmacologica sul sistema nervoso centrale e sul sistema respiratorio sono state incluse nello studio tossicologico; mentre lo studio del sistema cardiovascolare è stato eseguito in conigli juvenile. Studi di Farmacocinetica/Farmacodinamica *in-vivo* sono stati condotti sul sangue per dimostrare la biodisponibilità in topi juvenile (somministrazione singola e ripetuta)

e conigli juvenile (somministrazione singola). Per verificare la distribuzione e la persistenza negli organi è stato eseguito uno studio BPL di biodistribuzione tramite QWBA (*Quantitative Whole Body Autoradiography*) in topi juvenile. A seguito della somministrazione sistemica di BGA002 in modelli murini xenograft tumorali con *MYCN* amplificato si è registrato un effetto anti-tumorale caratterizzato da una potente dose-dipendenza. La risposta farmacodinamica *in-vivo* è dimostrata dalla riduzione della quantità di proteina N-*Myc* tramite analisi di immunoistochimica sulle masse tumorali estratte dagli animali trattati. I profili tossicologico e di sicurezza farmacologica hanno dimostrato che il BGA002 è ben tollerato.

In conclusione, gli studi preclinici dell'oligonucleotide anti-*MYCN* BGA002 hanno dimostrato una potente e specifica attività anti-tumorale *in-vitro* e *in-vivo* su diversi tumori positivi per *MYCN*. Considerando la sua consistente efficacia e il ben tollerato profilo tossicologico, BGA002 prosegue nel suo percorso di sviluppo verso uno studio clinico di Fase I in pazienti affetti da Neuroblastoma con espressione di *MYCN*.

Trial preclinici di prodotti biotecnologici e il giusto “bridging” verso gli studi clinici

Isabella Andreini

RTC Research Toxicology Centre, Pomezia (RM)

La moderna tossicologia deve ispirarsi oltre che ai principi delle 3R etiche (Ridurre, Rifinire, Rimpiazzare) anche ai principi delle 3R scientifiche (Rilevanza, Robustezza, Riproducibilità). Per tale motivo è importante prendere in considerazione le tendenze attuali nel campo della ricerca e sviluppo all'interno della comunità scientifica e regolatoria. Il processo di sviluppo di un nuovo prodotto farmaceutico, convenzionale,

biotecnologico o di terapia avanzata, prevede fasi di pura scoperta con prove di farmacologia *in vitro* e *in vivo* a cui seguono fasi di valutazione formale. Queste necessitano di standard di qualità molto controllati per poter assicurare l'oggettività del risultato e la tracciabilità del dato. Per assicurare questo controllo tradizionalmente le prove tossicologiche vengono svolte su animali sani, perché in questo modo l'esperienza e i dati storici di patologia spontanea aiutano a discriminare tra patologie casuali e quelle indotte dal prodotto in esame.

È però sempre più evidente che prodotti biotecnologici e di terapia avanzata presentano un profilo di sicurezza assai diverso tra modelli sani e modelli patologici. Per tale motivo da alcuni anni per prodotti di terapia avanzata viene accettato o addirittura richiesto di svolgere studi di tossicologia in modelli animali in cui si induce la patologia con trattamenti chimici o chirurgici o con modelli geneticamente predisposti a sviluppare le patologie di interesse. Questo approccio viene adesso anche “esplorato” per prodotti biotecnologici in cui si pone il problema del modello rilevante, dove per modello rilevante si intende il modello in cui il prodotto svolge la azione farmacologica che ci si attende nell'uomo.

Per molti prodotti biotecnologici e terapie avanzate anche l'uso di animali superiori ha spesso una predittività limitata e, inoltre, il precoce sviluppo di anticorpi anti-farmaco (ADA) può limitare notevolmente la durata dello studio di un prodotto previsto per terapia cronica.

Lo sviluppo di un farmaco è un complesso processo sequenziale, e solo una piccola percentuale dei farmaci che iniziano questo cammino poi lo concludono sul mercato. Le cause degli insuccessi sono dovute principalmente a insufficiente efficacia o problemi di sicurezza. Nella fase preclinica sono gli studi di sicurezza preclinica che, evidenziando i profili di tossicità, portano

ad un arresto nello sviluppo di un nuovo prodotto farmaceutico. Importante quindi è svolgere le necessarie prove di sicurezza su modelli rilevanti in cui il risultato sia traslabile all'uomo. Insomma è fondamentale, già prima di arrivare in clinica, valutare il rapporto rischio/beneficio con un approccio scientifico della interpretazione di dati per poter lanciare un ponte tra la valutazione preclinica e gli studi clinici.

Terapie cellulari: sfide nella ricerca e nello sviluppo preclinico

C. Bernardi, G. Di Gallo

Accelera Srl, Nerviano (MI)

Nel corso dell'ultimo decennio si è assistito ad un incremento esponenziale della comprensione dei meccanismi cellulari e biochimici che controllano la proliferazione cellulare in tessuti normali o patologici e dei meccanismi di controllo dell'attività cellulare.

Questo ha portato allo sviluppo di nuovi trattamenti e prodotti estremamente innovativi, come ad esempio prodotti contenenti cellule umane vitali. L'impiego di prodotti per la terapia cellulare (PTC) contenenti cellule umane rappresenta pertanto un nuovo approccio terapeutico mirato e talvolta individuale per contrastare patologie degenerative, ereditarie e oncologiche altamente eterogenee e difficilmente trattabili. I PTC sono molteplici sia per quanto riguarda la loro origine che per il tipo di cellule che li costituiscono. Le cellule possono infatti avere origine autologa o allogenica, possono essere a vari stadi di differenziamento partendo dalle cellule staminali fino a cellule completamente differenziate, possono aver subito diversi tipi di manipolazione *ex-vivo*, possono essere usate da sole o combinate sia con componenti non cellulari che in combinazione con altri trattamenti (es. citochine o fattori di crescita), e infine possono essere modificate geneticamente.

Inoltre, secondo le indicazioni terapeutiche, possono essere utilizzate per via sistemica o come terapia locale (es. strategie di ingegneria tissutale). Trattandosi di approccio e meccanismo d'azione innovativo, queste terapie hanno introdotto nuove tipologie di rischio e la necessità di ricorrere a processi di controllo mirati per la garanzia della sicurezza dei pazienti, fin dalle prime fasi di ricerca e successivamente nel corso dello sviluppo preclinico.

In particolare, anche su indicazione delle Autorità Regolatorie, le principali fonti di rischio da investigare a garanzia della sicurezza dei pazienti comprendono:

- Rischio proliferativo/oncogenetico
- Rischio di risposta infiammatoria/immunitaria
- Rischio associato alla presenza di contaminanti.

Nel corso della presentazione saranno affrontati e descritti gli aspetti peculiari, teorici e pratici, da considerare ai fini di allestire un protocollo di studio tossicologico adeguato a garantire un corretto *safety assessment* preclinico dei PTC.

La sfida di nuovi percorsi di regolamentazione per non ostacolare l'innovazione in campo farmaceutico

Annarita Meneguz

Istituto Superiore di Sanità, Roma

La valutazione scientifica dei dati è strategica per valutare la sicurezza, l'efficacia, la qualità dei farmaci.

Nuove linee guida e nuovi approcci sono pertanto necessari per trasferire le novità scientifiche al processo di revisione e colmare eventuali divari tra innovazione scientifica e revisione dei farmaci.

Tali approcci devono passare attraverso lo spettro della ricerca traslazionale compresa la ricerca in laboratorio *in vitro* e *in vivo*, la modellistica e la tossicologia,

e prevedere la collaborazione fra agenzie regolatorie, università e industria. Il processo di revisione deve necessariamente uscire dalle valutazioni a compartimenti e basarsi sulla disponibilità di team interdisciplinari di tossicologi, farmacologi, biologi molecolari, chimici, scienziati computazionali e medici per poter rispondere a domande normative che le nuove sfide meritano e prevedere revisione di progetti a più lungo termine che richiedono lo sviluppo di modelli predittivi, strumenti e biomarcatori per accelerare lo sviluppo e la valutazione di farmaci sicuri ed efficaci. La presentazione rivede il lavoro recente condotto a livello delle istituzioni nazionali ed europee in tale ambito.

La ricerca clinica nelle malattie rare: implicazioni metodologiche e ruolo della farmacovigilanza

**M. Morina¹, J. Angelini¹, A. Chiarenz²,
A. Coscarella², M. Scatigna²**

¹Scuola di Specializzazione in Farmacologia e Tossicologia Clinica, Università di Milano, ²Divisione Farmacovigilanza, Sanofi Italia, Milano

In condizioni ottimali l'approvazione di nuovi farmaci avviene a seguito di grandi *trial* che consentono di ottenere dati di qualità ed un'adeguata potenza statistica attraverso caratteristiche quali la randomizzazione, il disegno prospettico, la presenza di *endpoint* validati e rilevanti ed il controllo in doppio cieco. Nello studio di farmaci orfani spesso non è possibile realizzare studi di questo tipo a causa di numerose difficoltà. La popolazione risulta spesso fenotipicamente eterogenea, di ridotta numerosità a causa della bassa prevalenza della patologia e dispersa geograficamente. Anche da un punto di vista metodologico si rilevano difficoltà nella stima dell'*effect-size* atteso, nella carenza di *endpoint* validati e nel decorso variabile o poco noto della patologia. Il contesto in cui si realizzano gli studi è

caratterizzato da pochi centri specializzati e da una carenza di precedenti studi sulla patologia con implicazioni metodologiche ed etiche. A proposito di quest'ultimo aspetto è necessario sottolineare che nell'ambito delle patologie rare appare spesso improponibile la randomizzazione e che la popolazione è spesso pediatrica. Questo scenario comporta necessariamente accorgimenti di tipo metodologico ed organizzativo. Da un punto di vista metodologico è necessario ottimizzare l'efficienza statistica riducendo il campione e massimizzando il numero di pazienti in trattamento attivo. Questo può essere ottenuto selezionando una popolazione a rischio elevato, scegliendo opportuni *endpoint* ed utilizzando disegni di studio innovativi. Da un punto di vista organizzativo risultano fondamentali la creazione di reti a livello mondiale per l'integrazione dei dati raccolti, i metodi per agevolare la partecipazione del paziente alle visite e l'implementazione di strumenti digitali. Dopo l'autorizzazione, assume particolare importanza la fase post-marketing. I dati raccolti dalla Farmacovigilanza durante gli studi clinici, infatti, sono spesso inadeguati per la rilevazione di reazioni avverse rare o molto rare a causa della scarsa dimensione del database e per la presenza di un "rumore di fondo" che può derivare, ad esempio, dalla sopravvivenza del paziente in una fase della patologia mai osservata prima. In questo contesto, anche un singolo *case report* ben documentato acquista particolare rilevanza e necessita di un'adeguata indagine per valutare il nesso di causalità, la relazione temporale, l'eventuale risposta alla sospensione/riesposizione e gli elementi patologici sottostanti. Una raccolta nel tempo di singoli *case report* potrà essere studiata attraverso metodi Bayesiani. La creazione di reti internazionali che condividano, in forma anonima ma standardizzata, dati provenienti da diversi registri di patologia

o di prodotto, quando possibile, costituisce una importante fonte di dati verificati. Un'ulteriore fonte di dati verificati da un operatore sanitario è costituita dai report sulle reazioni avverse derivanti dai programmi di supporto al paziente. Anche il digitale potrebbe portare ad un miglioramento nella rilevazione di segnali di farmacovigilanza attraverso applicazioni specificamente studiate rivolte al paziente o mediante la rilevazione di parametri a distanza tramite strumenti indossabili o impiantabili. Alcuni autori si spingono ad ipotizzare un ruolo del digitale attraverso l'analisi dei *big data* derivanti dall'analisi dei commenti dei pazienti su siti specializzati sulla patologia o sui *social network* anche se questo approccio presenta problemi di mancanza di specificità, difficoltà di verifica e possibili duplicazioni dei dati raccolti attraverso i canali della farmacovigilanza. Certamente al momento appaiono sempre più importanti un approccio integrato che coinvolga i pazienti, lo Sponsor, l'Accademia ed il Regolatorio, il coinvolgimento delle associazioni dei pazienti, l'integrazione dei registri internazionali, la creazione di *clinical trial network* ed un nuovo approccio digitale.

Problematiche tossicologiche riproduttive

(Giorno 12 aprile 2018, 16.00-17.30)

Uso dei farmaci antinfiammatori ed immunosoppressori in gravidanza

M. De Santis, C. De Luca

Polo Scienze della Salute della Donna e del Bambino, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Le patologie autoimmuni affliggono con maggiore frequenza le donne in età fertile, per cui il trattamento di tali disordini durante la gravidanza necessita di una particolare attenzione. Finalità della terapia è infatti il raggiungimento

del controllo della malattia minimizzando i rischi materno-fetali. Il regime terapeutico ottimale durante la gravidanza viene influenzato da molteplici fattori, tra cui il tipo di patologia, la sua severità e l'epoca gestazionale. I glucocorticoidi a basse dosi (in particolare prednisone, prednisolone, metilprednisolone) rappresentano i farmaci di scelta per le donne affette da patologie autoimmuni in forma lieve. I farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) possono essere impiegati dall'inizio del secondo trimestre fino alla trentesima settimana di gestazione. Il loro impiego dopo la trentaduesima settimana è infatti stato associato alla chiusura precoce del Dotto di Botallo. Se assunte in epoca preconcezionale, Idrossiclorochina e Sulfasalazina possono essere continuate durante la gravidanza. Nelle forme moderate e severe possono essere impiegati Glucocorticoidi, Idrossiclorochina, Azatioprina, Ciclosporina, Tacrolimus, Immunoglobuline per via endovenosa ed inibitori del *Tumor Necrosis Factor*. L'impiego di farmaci quali Metotrexate e Micofenolato Mofetile dovrebbe essere evitato per via dei documentati effetti teratogeni. Scarsi sono, ad oggi, i dati riguardanti l'esposizione in gravidanza a farmaci biologici. In conclusione, il trattamento delle patologie autoimmuni in gravidanza richiede una particolare attenzione da parte di una equipe multidisciplinare, al fine di impostare un adeguato trattamento con farmaci immunosoppressori e/o antinfiammatori, ponderando il rapporto rischio-beneficio in relazione al contesto clinico e all'epoca gestazionale.

Rischio embrio-fetale da farmaci antiepilettici

Alessandra Pistelli

Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

I farmaci antiepilettici vengono utilizzati per il trattamento di alcune patologie neurologiche

(epilessia, dolore neuropatico) e psichiatriche (disturbo bipolare) riscontrabili anche durante la gravidanza ed è noto che alcuni di essi possono essere responsabili di un aumento del rischio malformativo di base. Una patologia cronica non adeguatamente trattata può essere responsabile di esito avverso della gestazione (aborto spontaneo, parto pretermine, pre-eclampsia, gestosi) o dello sviluppo fetale (difetti congeniti) e per tale motivo sarebbe auspicabile, in previsione di una gravidanza, poter scegliere il trattamento con un farmaco di comprovata efficacia e dotato del minor rischio teratogenico possibile. Nei figli di madri epilettiche è stata dimostrata una maggior frequenza di malformazioni e, nonostante i numerosi studi, non è stato ancora chiarito il ruolo teratogeno dei farmaci o della patologia stessa.

La supplementazione con acido folico al dosaggio di 5 mg/die da effettuare prima dell'inizio della gravidanza può ridurre significativamente il rischio malformativo, in particolare per quanto riguarda i difetti del tubo neurale e del cuore [1].

I dati osservati presso il nostro centro dimostrano che, analogamente a quanto riportato in letteratura [2], il rischio di malformazioni congenite è maggiore nelle donne epilettiche in trattamento farmacologico rispetto alle donne affette da patologia psichiatrica in terapia con farmaci anticonvulsivanti, usati come stabilizzatori del tono dell'umore, e rispetto ad una popolazione di controllo.

L'approccio multidisciplinare con il coinvolgimento del tossicologo, del neurologo, dello psichiatra e del ginecologo sarebbe sempre auspicabile, in particolare quando la donna si rivolge ai servizi sanitari a gravidanza già iniziata. In questa maniera sarà possibile programmare gli accertamenti di secondo livello e le visite di controllo specialistiche.

Aspetti clinici dei disordini dello spettro alcolico fetale (FASD) nel bambino

Luigi Tarani

Sapienza Università di Roma, Policlinico Umberto I, Roma

La sindrome feto-alcolica è una condizione malformativa complessa del neonato e del bambino, descritta da Lemoine (1968) e classificata da K. Jones (1973), dovuta all'effetto teratogeno dell'alcool assunto durante la gravidanza. Essa è la più comune causa di ritardo mentale acquisito nell'infanzia, pertanto totalmente evitabile mediante l'astensione completa della gestante dal consumo di alcool. Gli effetti dell'alcool sul feto variano dall'assenza di danni all'aborto, comprendendo uno spettro di manifestazioni cliniche definito FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*) che, oltre alla FAS, include la FAS parziale (PFAS), i difetti congeniti neonatali associati all'alcool (ARBD: *Alcohol Related Birth Defects*) ed i disturbi dello sviluppo neurologico associati all'alcool (ARND: *Alcohol Related Neurodevelopmental Disorders*). L'incidenza varia: in Europa è stata stimata del 1-3:10.000, mentre negli USA del 2-7:1000 per la FAS e del 2-5% per la FASD. L'unico dato italiano riguarda la prevalenza nel Lazio, che per la FAS è del 3,7-7,4:1000 e per la FASD del 2-4%.

Perché il pediatra può sospettarla

In epoca neonatale si può sospettare la FAS in presenza di un piccolo per l'età gestazionale (SGA) con microcefalia e dismorfismi tipici. Il dato della microcefalia è saliente in quanto gli SGA in genere sono relativamente macrocefalici. Durante l'età pediatrica la diagnosi è più agevole perché, oltre al difetto di crescita ed ai segni dismorfici del volto, si possono rilevare il ritardo psicomotorio, i disturbi del comportamento ed il deficit di attenzione e concentrazione. Nell'adolescenza, ai segni tipici dell'età pediatrica si possono sommare problemi comportamentali, scolastici e, soprattutto, sociali.

[1] Wald NJ, Law MR, Morris JK, Wald DS. Quantifying the effect of folic acid. *Lancet*. 15; 2069-73. 2001.

[2] Cassina M, Dilaghi A, Di Gianantonio E, Cesari E, De Santis M, Mannaioni G, Pistelli A, Clementi M. Pregnancy outcome in women exposed to antiepileptic drugs: teratogenic role of maternal epilepsy and its pharmacologic treatment. *Reprod Toxicol*. 39: 50-7. 2013.

Criteri clinici di diagnosi

Per la mancanza di test genetici o biochimici diagnostici, il passo decisivo per identificare un soggetto affetto da FASD consiste nell'accertare il consumo alcolico materno durante la gravidanza. L'assenza di questo dato, molto spesso difficile da ottenere per il senso di colpa delle madri, comunque non esclude la diagnosi, che va formalizzata seguendo le recenti linee guida (Hoyme HE, 2016) che si basano sull'approccio multidisciplinare alla diade madre-bambino e sono volte ad analizzare 3 aspetti essenziali della sindrome:

- 1) le anomalie morfologiche del neonato,
- 2) lo sviluppo neuropsicologico, intellettuale e sociale del bambino,
- 3) i fattori di rischio materni.

Le linee guida diagnostiche suddividono la FASD in varie forme.

I-FAS (richiesti tutti i criteri A-D)

Con o senza conferma dell'assunzione materna di alcool in gravidanza

A. Presenza di due o più anomalie facciali tra:

1. Rime palpebrali brevi (<10° percentile)
2. Labbro superiore sottile (score 4 o 5)
3. Filtro lungo e piatto (score 4 o 5)

B. Ritardo di crescita pre e postnatale (statura e/o peso <10° percentile)

C. Microcefalia o anomalie strutturali cerebrali o convulsioni non febbrili ricorrenti

D. Deficit neuro-comportamentali (< o > dei 3 anni)

< di 3 anni: ritardo mentale: > 1,5

DS sotto la media

> di 3 anni

- 1) Con difetto cognitivo
 - a) globale: abilità concettuale generale o QI verbale, spaziale, di performance: > 1,5 DS sotto la media

b) almeno 1 dominio neuro-comportamentale tra funzioni esecutive, linguaggio, memoria, abilità visuo-spaziale: > 1,5 DS sotto la media

- 2) Con disturbi del comportamento, senza difetto cognitivo deficit in almeno 1 dominio tra regolazione dell'umore, attenzione, controllo degli impulsi: > 1,5 DS sotto la media

II-FAS parziale

Con conferma di assunzione materna di alcool in gravidanza: richiesti criteri A-B

Senza conferma, richiesti criteri A-C

- A. Presenza di due o più delle anomalie facciali (punto A della FAS completa)
- B. Deficit neuro-comportamentale (punto D della FAS completa)
- C. Ritardo di crescita pre e/o post natale

III-ARND richiesti i criteri A e B (la diagnosi non può essere posta in bambini <3 anni)

- A. Conferma assunzione materna di alcool in gravidanza
- B. Anomalie cognitive-comportamentali (punto D della FAS completa)

IV- ARBD richiesti i criteri A e B

- A. Conferma assunzione materna di alcool in gravidanza
- B. Difetti congeniti strutturali (uno o più a carico di cuore, reni, scheletro, orecchie, occhi e anomalie minori)

Quadro clinico e complicanze mediche

Ritardo di crescita: i soggetti con FASD mostrano costantemente un ritardo di crescita postnatale che esordisce in epoca pre-natale in quanto l'esposizione all'alcool del feto, specialmente se nel III trimestre, ne riduce fortemente lo sviluppo somatico. I neonati possono essere piccoli per l'età

gestazionale (SGA) e rimanere al di sotto della media staturale anche nella vita infantile ed adulta. Alcuni bambini con FASD, probabilmente perché non esposti all'alcol nell'ultimo trimestre, possono avere dei normali parametri di crescita, ma sviluppare secondariamente il deficit di apprendimento ed i deficit cognitivi.

Anomalie facciali: i soggetti con la FAS presentano 3 anomalie specifiche maggiori quali: le rime palpebrali brevi (pari o inferiori al 10° percentile), il filtro naso-labiale allungato ed appianato ed il labbro superiore sottile. Possono avere anche dimorfismi associati minori, in quanto meno frequenti, quali: l'epicanto, l'ipertelorismo, la radice nasale piatta con un naso corto a narici antverse, l'ipoplasia degli zigomi, le anomalie di posizionamento delle orecchie con un aspetto "a binario ferroviario" della cartilagine dell'antelice e la micrognatia.

L'identificazione delle tre principali alterazioni facciali, tipiche della FASD, può essere effettuata utilizzando alcune guide standard di riferimento, come quelle di labbra e *philtrum* e con l'ausilio dei nomogrammi dei percentili di crescita, per età e sesso, delle rime palpebrali, delle distanze interpupillari ed intercantali e del filtro, per la cui rilevazione è necessario munirsi di un righello rigido, possibilmente trasparente.

I parametri dismorfologici devono essere rilevati a tutte le età, ma se i segni facciali del paziente si sono attenuati nel tempo, la diagnosi delle anomalie facciali dovrà essere posta basandosi sul periodo in cui queste erano maggiormente espresse, eventualmente con l'ausilio di foto. È importante infatti osservare come la facies dei soggetti affetti da FAS rimanga fondamentalmente inalterata nel tempo.

Difetti Congeniti Strutturali: essi comprendono anomalie dei vari organi quali:

- **Cuore (25-50%):** con difetti inter-atriali o inter-ventricolari, anomalie cono-truncali o dei grandi vasi.
- **Renii (4%):** con aplasie, ipoplasie, displasie renali, reni a ferro di cavallo, duplicazioni

reno-ureterali.

- **Scheletro:** con sinostosi radio-ulnare, difetti segmentazione vertebrale con fusione vertebre cervicali (50%), anchilosi delle grosse articolazioni, scoliosi (15%).

- **Orecchie:** con ipoacusia mista (90%) o neurosensoriale (30%).

- **Occhi:** con microftalmia, strabismo, ptosi palpebrale ed anomalie vascolari retiniche con difetto visivo associato.

- **Denti:** con carie frequenti, palato ogivale e malocclusione di Classe III con la crescita.

- **Anomalie dismorfiche minori** quali: unghie ipoplasiche, brevità e clinodattilia del V dito, camptodattilia, plica palmare a "mazza da hockey" e pectus excavatum/carinatum.

Anomalie del Sistema Nervoso Centrale: i numerosi studi sui danni dovuti a esposizione intrauterina all'alcol mostrano uno spettro di esiti, cognitivi e comportamentali, a breve e lungo termine, derivanti proprio da anomalie strutturali e funzionali del SNC.

L'**alterazione strutturale** principale della FASD è la microcefalia, spesso accompagnata da un scarso accrescimento complessivo. Studi di risonanza magnetica (MRI) mostrano peraltro una riduzione complessiva del volume cerebrale ed una disorganizzazione del SNC, con specifiche anomalie strutturali di aree vulnerabili all'alcol quali corpo calloso (agenesia, ipoplasia), corteccia cerebrale, cervelletto, nucleo caudato e ippocampo che sono state correlate con le **alterazioni funzionali specifiche**.

Tra i disturbi funzionali vanno annoverati segni neurologici quali spasticità, asimmetrie nei riflessi e, soprattutto, crisi convulsive, la cui incidenza non è ancora chiara, ma che comportano la conferma con EEG ed eventualmente la terapia.

Test genetici di conferma

La definizione dei segni dismorfici richiede che vengano eseguite precise misurazioni della statura, del peso e della circonferenza cranica, ma anche della lunghezza delle fessure palpebrali e del

filtro. Tutti questi dati sono patologici se risultano al disotto del 10° percentile. Anche l'aspetto del filtro e del labbro superiore, che sono dati qualitativi, sono stati resi misurabili come dati quantitativi dall'impiego della *Lip-Philtrum Guide*. Una volta sospettato un quadro sindromico, è bene ottenere la conferma dell'assunzione materna di alcool in gravidanza (fattori di rischio materni, adozione da paesi dell'Est Europa) e ricercare difetti congeniti associati mediante le ecografie di encefalo, cuore ed addome, l'Rx dello scheletro e l'eventuale RMN dell'encefalo, l'EEG, il test audiometrico e l'esame della vista, nonché eseguire i test genetici di *screening* come l'esame del cariotipo e l'array-CGH. In questo modo è possibile porre la diagnosi differenziale con le sindromi che hanno segni in comune, come le malattie cromosomiche e da microdelezioni/duplicazioni o le sindromi genetiche. Infatti una diagnosi di FASD in un bambino con disabilità non può essere posta automaticamente per il solo fatto che la madre abbia assunto alcool in gravidanza e, specie se questa conferma manca, la diagnosi di FASD deve essere posta come *diagnosi di esclusione*.

Prognosi intellettiva e di sopravvivenza

Nei pazienti con FASD, quando è presente ritardo mentale, esso persiste, ma con miglioramenti correlati con le terapie riabilitative. I problemi psico-comportamentali, se non riconosciuti e trattati precocemente, possono favorire il peggioramento della qualità della vita.

Da uno studio di Streissguth *et al.* è emerso che tra le persone di età compresa tra 6 e 51 anni affette da FASD:

- Il 94% ha problemi di salute mentale e nel 23% la malattia mentale richiede assistenza ospedaliera
 - L'83% degli adulti ha problemi di dipendenza
 - Il 79% degli adulti ha problemi di occupazione
- Nei ragazzi di età superiore ai 12 anni invece si è visto che:
- Il 61% ha una esperienza scolastica perturbata
 - Il 60% ha problemi con la legge
 - Il 49% assume comportamenti sessuali inappropriati
 - Il 35% ha problemi di alcool/droga

Complicanze mediche note

Le principali complicanze ascrivibili ai quadri FASD sono soprattutto relative a problematiche di natura neuro-cognitiva e

Tabella Diagnosi differenziale FAS-altre sindromi

| Sindrome | Sindrome di Aarskog | Sindrome di Williams | Sindrome di Noonan | Sindrome di Dubowitz | Sindrome di Brachmann-De Lange | Embriopatia da toluene | Sindrome fetale da Dilantin | Sindrome fetale da Valproato | Effetti sul feto di fenilchetonuria materna |
|-------------------------|--|--|---|--|---|--|---|---|--|
| Segni comuni alla FASD | Naso piccolo a sella, narici anteverse, philtrum ampio, ipertelorismo | Rime palpebrali brevi, narici anteverse, philtrum allungato, epicanto, naso a sella | Ponte nasale abbassato, ipertelorismo, epicanto | Rime palpebrali brevi, ipertelorismo, epicanto | Philtrum allungato, labbro superiore assottigliato, ponte nasale depresso | Rime palpebrali brevi, ipoplasia viso mediano, labbro superiore assottigliato | Ipertelorismo, ponte nasale depresso | Narici anteverse, philtrum allungato, ipertelorismo | Epicanto, rime palpebrali brevi, philtrum appiattito, labbro superiore sottile |
| Caratteri differenziali | Faccia rotonda, ptosi palp., piega sotto il labbro inferiore, problemi di eruzione dentale | Bocca ampia, pattern a stella dell'iride, rigonfiamento periorbitale, disturbi delle cartilagini | Cheratocono, ptosi palpebrale, bocca ampia con protrusione del labbro superiore | Cresta sovraorbitale bassa con ponte del naso a livello della fronte | Sopracciglio singolo a cespuglio lungo la fronte, ciglia lunghe, arti corti, palato ad arco acuto | Micrognazia, fontanella anteriore aperta, anomalie dei capelli, restringimento bifrontale. | Naso corto con labbro superiore ad arco | Fronte alta, piega infraorbitale, bocca piccola | Naso piccolo a sella, glabella prominente, faccia arrotondata |

comportamentale. Tra i deficit cognitivi quelli più comuni sono le difficoltà linguistiche sia di produzione che di comprensione e i disturbi dell'attenzione. Il ritardo mentale, invece, non rappresenta una caratteristica costante della sindrome in quanto il QI del bambino può variare da un range di normalità fino a una grave disabilità. Molto frequenti sono i deficit nelle funzioni esecutive (ragionamento per gradi, pianificazione, giudizio, soluzione di

problemi, monitoraggio) ed i disturbi del comportamento (difficoltà ad assumere un contegno appropriato, labilità emotiva, scarso rendimento scolastico ed interazione sociale carente), che pregiudicano enormemente l'adattamento sociale.

In Italia la Sindrome Feto-Alcolica è classificata tra le Malattie Rare ed il DM 279 del 18/5/200 ha assegnato a questa condizione il codice di esenzione: RP0040.

Tabella riassuntiva per il *follow up* clinico

| Valutazione specialistica/ esame strumentale | Cadenza |
|--|---|
| Valutazione pediatrica con misurazione dei parametri auxologici | Alla diagnosi, poi annuale |
| Valutazione Neuropsichiatrica Infantile e riabilitazione neuro-comportamentale | Alla diagnosi e successivamente a seconda dell'evoluzione |
| Valutazione neurologica e EEG | Alla diagnosi, successivamente a seconda dell'andamento delle problematiche |
| Valutazione oculistica | Alla diagnosi, successivamente biennale |
| Valutazione ortopedica/fisiatrice | Alla diagnosi, successivamente con tempistiche determinate dalle problematiche presenti |
| Valutazione cardiologica | Alla diagnosi, successivamente a seconda dell'andamento delle problematiche |
| Visita odontoiatrica | Ogni sei mesi |
| Valutazione ORL | Alla diagnosi, successivamente annuale |
| Ecografia addominale/urinaria | Alla diagnosi, successivamente con tempistiche determinate dalle problematiche presenti (IVU/enuresi) |

Cassidy e Allanson, modificata, 2010.

Problematiche cliniche specifiche da considerare in caso di urgenza/emergenza

| Complicanza acuta o malformazione maggiore | Percentuale |
|---|-------------|
| Complicanze mediche acute letali o gravi | 0% |
| SNC (Microcefalia, Idrocefalo: segni di ipertensione endocranica, Assenza del corpo calloso, Anomalie cerebellari, Anomalie della migrazione neuronale) convulsioni | 50-80% |
| Cardiache: complicanze mediche delle cardiopatie congenite (DIV, DIA) | 25-50% |
| Denti: carie dentale | 50% |
| Sviluppo psico-intelletivo (ADHD) | 75-100% |

Abuso di sostanze e farmacoterapia in allattamento

M. Gallo, G. Bacis

UOSD Centro Antiveleeni e Tossicologia, Teratology Information Service (TIS), ASST Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

L'allattamento al seno presenta numerosi vantaggi sanitari e psicosociali, sia per il lattante che per la madre. Il latte materno rappresenta l'alimento ideale per il neonato per tutto il primo anno di vita essendo sicuro dal punto di vista microbiologico, bilanciato da un punto di vista nutrizionale, inoltre contiene sostanze immunologicamente attive. È stato dimostrato che migliora la sopravvivenza infantile, riduce l'incidenza di malattie infettive, riduce il rischio di patologie allergiche ed asma, migliora lo sviluppo psico-intellettuale; l'allattamento al seno favorisce il benessere emozionale e psicologico della madre, riduce il rischio di tumori della mammella e dell'ovaio. Una delle motivazioni che talvolta pone problemi durante l'allattamento al seno è rappresentata dalle terapie farmacologiche materne e dall'uso/abuso di sostanze psicotrope. Le terapie farmacologiche non rappresentano una controindicazione assoluta all'allattamento al seno. La maggior parte dei farmaci passa nel latte materno solo in piccolissima quantità. La quantità di farmaco che passa dal plasma al latte materno dipende dalle caratteristiche del farmaco stesso. In generale, contribuiscono al passaggio plasma-latte un basso legame alle proteine plasmatiche, un basso peso molecolare e un'elevata lipofilia. La sicurezza di alcuni farmaci dipende anche dall'età del neonato. In generale, neonati e prematuri hanno una diversa capacità di assorbire ed eliminare farmaci rispetto a lattanti più grandi. Nella maggioranza dei casi, interrompere l'allattamento è probabilmente più dannoso del farmaco stesso. I rischi sono sicuramente maggiori nel caso dell'uso/abuso di sostanze psicotrope da parte della madre. L'esposizione ad

alcol o sostanze d'abuso può interferire con la capacità di giudizio della madre, compromettendo la possibilità di prendersi cura del neonato, nonché essere causa di importanti effetti tossici nel lattante. Alcol e sostanze d'abuso passano nel latte materno in maniera differente le une dalle altre e possono determinare effetti nel lattante sia a breve che a lungo termine. L'alcol è stato associato ad un alterato sviluppo motorio e a scarsa crescita dopo la nascita, a diminuzione del consumo di latte e disturbi del sonno.

Il fumo di sigaretta espone il lattante a concentrazioni di nicotina che risultano essere maggiori di circa 2-3 volte la concentrazione plasmatica materna. Nicotina e cotinina, principale metabolita della nicotina, sono escreti nel latte materno in quantità proporzionali al numero di sigarette fumate. Inoltre, la *clearance* della nicotina nel lattante è notevolmente più lenta rispetto alla *clearance* materna.

Il consumo di cannabis da parte di donne che allattano è controindicato. Il Delta-9-Tetraidrocannabinolo (THC), principale alcaloide psicoattivo, è liposolubile e per uso continuato tende ad accumularsi nel latte materno in elevate concentrazioni, con livelli fino a 8 volte più elevati nel latte rispetto al plasma materno. I dati disponibili sugli effetti a lungo termine nel lattante per esposizione a cannabis sono scarsi.

La cocaina viene assorbita rapidamente e si distribuisce nei tessuti e nel latte materno. Sono stati riportati casi di tossicità da cocaina (convulsioni, irritabilità, agitazione, vomito, diarrea, brividi) in lattanti esposti attraverso il latte materno.

L'eroina passa nel latte in quantità sufficiente a determinare dipendenza nel lattante e sintomi di astinenza in seguito alla sospensione dell'allattamento.

Anche l'utilizzo di sostanze psicoattive come amfetamina, metamfetamina o sostanze allucinogene rappresenta

un elevato rischio per il lattante per l'elevato passaggio nel latte materno e i possibili effetti sul lattante (tachicardia, ipertensione, convulsioni).

L'uso/abuso di alcol e sostanze psicotrope può rappresentare un elevato rischio per i lattanti che deve essere sempre valutato con attenzione.

Contaminanti di processo (Giorno 12 aprile 2018, 16.00-18.00)

Valutazione del rischio per la presenza di acrilamide e furani negli alimenti

Luisa Ramos Bordajandi

Unità BIOCONTAM, Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, Parma

La cottura ad alte temperature e i trattamenti termici a livello industriale possono portare alla formazione di contaminanti chimici negli alimenti. In seguito a richieste da parte della Commissione Europea, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha recentemente pubblicato due pareri scientifici sul rischio per la salute pubblica relativo alla presenza di acrilamide negli alimenti e furani e metilfurani negli alimenti. L'acrilamide si forma come risultato della reazione di Maillard fra zuccheri ed amminoacidi durante la preparazione di alcuni tipi di alimenti a temperature superiori a 120° C e in condizioni di bassa umidità. La valutazione dei dati tossicologici ha condotto l'EFSA a concludere che l'acrilamide è una sostanza genotossica e cancerogena. Altri effetti critici sono stati identificati sul sistema nervoso, il sistema riproduttivo e lo sviluppo. L'analisi della relazione di dose-risposta sui dati tossicologici sperimentali, effettuata tramite l'applicazione dei modelli di *Benchmark dose* (BMD), ha portato alla selezione di valori di BMDL₁₀ pari a 0.43 mg/kg di peso corporeo pari a 0.43 mg/kg di peso corporeo/die per gli effetti di

neuropatia periferica e 0.17 mg/kg di peso corporeo/die per gli effetti neoplastici. La valutazione degli studi epidemiologici disponibili non hanno identificato dati utilizzabili per la caratterizzazione della relazione di dose risposta nell'uomo. I dati sulla presenza di acrilamide negli alimenti hanno evidenziato concentrazioni maggiori nel caffè e nei suoi succedanei e nei prodotti a base di patate fritte. La stima dell'esposizione cronica ha indicato livelli giornalieri fino a 3.4 µg/kg di peso corporeo. Considerando la genotossicità e carcinogenicità dell'acrilamide, l'EFSA ha impiegato l'approccio dei Margini di Esposizione (MOE) per la caratterizzazione del rischio e non è stata stabilita una Dose Giornaliera Tollerabile (DGT). Sebbene gli studi epidemiologici non abbiano confermato una chiara associazione fra l'esposizione ad acrilamide e l'aumento dell'incidenza tumorale, i margini di esposizione calcolati, basati su evidenze in animali da esperimento, indicano una possibile preoccupazione per la salute pubblica. I furani e metilfurani si formano da differenti precursori negli alimenti, come acido ascorbico, amminoacidi, carboidrati, acidi grassi insaturi e carotenoidi; sono rilevati in una molteplicità di alimenti come il caffè e gli alimenti conservati in contenitori di metallo o in vetro. La valutazione dell'EFSA si è basata principalmente sul furano, a causa della limitata disponibilità di dati sulla tossicità dei metilfurani e sui relativi livelli di concentrazione negli alimenti. Negli animali di laboratorio il furano, in seguito ad attivazione metabolica, induce tossicità e carcinogenicità epatica. Sebbene il modo d'azione non sia completamente delucidato, non è stato possibile escludere che il furano possa indurre la formazione dei tumori epatici attraverso un'azione genotossica diretta, e di conseguenza non è stata stabilita una DGT. L'applicazione dei modelli BMD, dei valori di BMDL₁₀ pari a 0.064 e 1.31 mg/kg di peso corporeo/

die sono stati calcolati rispettivamente per gli effetti non-neoplastici e neoplastici del furano e impiegati per la stima dei margini di esposizione. I maggiori livelli di esposizione cronica giornaliera, pari a 1.8 µg/kg di peso corporeo, sono stati stimati per i neonati tramite gli alimenti pronti al consumo. Nella popolazione adulta il caffè porta il maggior contributo all'esposizione. Anche nel caso del furano i margini di esposizione calcolati indicano una possibile preoccupazione per la salute pubblica.

TTC: un approccio metodologico per contaminanti sconosciuti

Corrado L. Galli

Università degli Studi di Milano

Quando, durante il monitoraggio di routine di un alimento, in un laboratorio di controllo di qualità, viene rilevato un segnale cromatografico non osservato in precedenza durante le analisi di un lotto di produzione per lo stesso alimento, necessitano degli approfondimenti al fine di valutare la sicurezza di queste "nuove sconosciute" sostanze presenti in tale materia prima. Un ulteriore approfondimento analitico al fine di una migliore identificazione può essere lungo, costoso e in alcuni casi difficile. Inoltre, in molti casi, non saranno disponibili informazioni tossicologiche per la sostanza. Pertanto, è necessario sviluppare strumenti pragmatici per una valutazione della potenziale tossicità di sostanze, con identità sconosciuta, in tempi brevi.

Viene descritto un approccio graduale che utilizza il giudizio esperto sulla fonte del cibo, informazioni sulle tecniche analitiche, il consumo alimentare di fonti alimentari contenenti la sostanza sconosciuta e informazioni quantitative della sostanza sconosciuta per valutare la sicurezza del consumatore utilizzando come mezzo di prioritizzazione il *Threshold of Toxicological Concern* (TTC). Seguendo questo approccio graduale, potrebbe essere possibile

applicare una soglia TTC di 90 µg/giorno per una sostanza sconosciuta nel cibo.

Valutazione del rischio per i contaminanti di processo presenti negli oli vegetali raffinati

Marco Binaglia

Unità BIOCONTAM, Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, Parma

Una serie di contaminanti derivati dal glicerolo si può formare in seguito a specifici processi industriali, ad esempio durante la produzione di salsa di soia e proteine vegetali idrolizzate e la raffinazione di oli vegetali. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha valutato il rischio relativo ad alcuni di questi contaminanti negli alimenti, in particolare il 3-monocloropropan diolo (3-MCPD) ed i relativi esteri degli acidi grassi, e i glicidil esteri degli acidi grassi (GE). I dati riguardanti la presenza di questi contaminanti negli alimenti hanno indicato dei livelli particolarmente elevati principalmente nell'olio e nei grassi di palma, e in altri oli vegetali sottoposti a raffinazione. In base alle evidenze sperimentali, le forme esterificate sono largamente idrolizzate prima dell'assorbimento sistemico e conseguentemente la valutazione del rischio è basata principalmente sulle rispettive sostanze libere, 3-MCPD e glicidolo. L'analisi dei dati tossicologici sperimentali sul 3-MCPD ha evidenziato il rene e il sistema riproduttivo maschile come principali organi bersaglio. Negli animali da esperimento l'esposizione cronica a 3-MCPD è associata allo sviluppo di tumori nel rene, tuttavia, in assenza sostanziale di genotossicità *in vivo*, e probabilmente secondario agli effetti nefrotossici è la conseguente iperplasia rigenerativa. Utilizzando i modelli di *Benchmark Dose* (BMD) per lo studio della relazione di dose-risposta, l'EFSA ha calcolato un BMDL₀ di 0.2 mg/kg di peso corporeo/die per l'incidenza di iperplasia tubulare, che ha portato a stabilire una Dose Giornaliera Tollerabile (DGT) di 20 µg/kg di peso

corporeo. Per quanto riguarda il glicidolo, la valutazione dei dati tossicologici ha fornito sufficienti evidenze per considerare la sostanza come genotossica e cancerogena. Tuttavia, le limitazioni presenti negli studi a lungo termine disponibili per la valutazione hanno permesso solamente una stima approssimativa della caratterizzazione del pericolo attraverso la derivazione della dose associata con un aumento del 25% di incidenza tumorale (T25). Questa dose è stata utilizzata per stimare i margini di esposizione (MOE) ai GE, in base all'approccio raccomandato da EFSA per le sostanze genotossiche e cancerogene. La stima dell'esposizione cronica ha evidenziato dosi giornaliere più elevate nelle classi più giovani della popolazione, arrivando a 3.2 µg/kg di peso corporeo per 3-MCPD e 4.9 µg/kg di peso corporeo per il glicidolo. La caratterizzazione del rischio ha portato a concludere che i GE costituiscono un potenziale problema per la salute per tutte le fasce d'età più giovani e mediamente esposte, nonché per i consumatori di tutte le età con esposizione elevata. Per il 3-MCPD e i relativi esteri, la DGT stabilita è leggermente superata solamente nel caso dei forti consumatori delle fasce di età più giovane.

Effetti di salute del consumo di caffè: i dati epidemiologici

Andrea Poli
Milano

Il consumo di caffè, probabilmente per il contenuto in caffeina, è spesso considerato, dal mondo medico, un potenziale fattore di rischio cardiovascolare, per i possibili effetti sui livelli pressori e sulla comparsa di ipertensione, per la possibile induzione di aritmie e per i disturbi del sonno indotti, in molte persone, dal suo consumo. La prassi da parte della comunità medica e cardiologica, di conseguenza, è di limitare l'apporto di caffè in tutte le persone portatrici di anomalie dei valori pressori

e, più in generale, di aumentato rischio cardiovascolare.

Gli studi osservazionali, ed alcune recenti metanalisi, sembrano in realtà suggerire che il consumo di caffè, specie se mantenuto entro i limiti equivalenti a 2-3 tazzine al giorno, non si associ a nessun incremento del rischio cardiovascolare o di mortalità per tutte le cause. In alcune metanalisi si osserva una riduzione del rischio associata ai livelli di consumo ricordati. Poiché questo meccanismo protettivo trova giustificazione negli effetti di alcuni componenti antiossidanti delle bevande a base di caffè, e poiché numerosi studi confermano gli effetti favorevoli, anche a livello vascolare, di tale consumo, appare corretto riconsiderare le controindicazioni prima ricordate. Sulla base di dati più recenti non sempre infatti sembra esserci motivo, nemmeno presenza, di un alto rischio cardiovascolare, di una restrizione di moderati consumi di caffè.

Dal fitocomplesso all'integratore alimentare: qualità, efficacia e rischi per la salute

(Giorno 13 aprile 2018, 9.00-11.00)

I fitochimici tra evidenze precliniche ed efficacia clinica: l'esempio della quercetina

Gian Luigi Russo

Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Avellino

Il concetto che i fitochimici possono rappresentare un efficace aiuto nella terapia di molte patologie cronico e degenerative, incluso il cancro, è profondamente radicato nella popolazione. Tale convinzione deriva spesso dall'osservazione che tali composti bioattivi agiscono da potenti e/o potenziali antiossidanti naturali. In una recente pubblicazione del nostro gruppo di

1 Russo GL, Tedesco I, Spagnuolo C, Russo M. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Semin Cancer Biol.* 2017; 46:1-13.

ricerca si è voluto affrontare criticamente questo aspetto, mettendo in evidenza le contraddizioni del settore soprattutto legate ai diversi risultati ottenuti nei trials clinici rispetto agli studi preclinici (principalmente linee cellule e modelli murini). L'altro importante motivo che contribuisce a generare dati conflittuali è la mancanza, in molti studi, di una chiara distinzione tra effetti dei fitochimici nella prevenzione primaria in soggetti a rischio, quando la patologia è probabile ma non ancora presente, rispetto alla loro somministrazione in terapia, quando la malattia si è manifestata. Dall'analisi critica della letteratura è emersa la necessità di rivedere i modelli preclinici utilizzati selezionandoli e/o disegnandoli al fine di fornire risposte specifiche in termini di possibile efficacia clinica (1). Un buon esempio deriva dal potenziale uso della quercetina nella leucemia linfatica cronica (LLC). La quercetina è il polifenolo (classe flavonoidi, sottoclasse flavonoli) più abbondante nella nostra dieta ed in grado di modulare diversi hallmarks del cancro, incluso la resistenza all'apoptosi. Precedenti studi del nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato la capacità della quercetina di sensibilizzare in maniera sinergica diverse linee cellulari e cellule leucemiche isolate da pazienti affetti da LLC ad agenti pro-apoptotici (ad es. induttori dei *death receptors* CD95 e TRAIL) o farmaci chemioterapici (fludarabina, ABT-737, altri BH3-mimetici). Questo effetto è mediato dai cambiamenti nell'espressione di Mcl-1, una proteina anti-apoptotica appartenente alla famiglia Bcl-2, la cui espressione ed attività sono state associate alla resistenza apoptotica nella LLC. Utilizzando la nuova linea cellulare HG3 derivata da cellule leucemiche immortalate con il virus Epstein-Barr, si è dimostrato che l'associazione tra il farmaco ABT-737 e la quercetina attiva in maniera sinergica l'apoptosi attraverso l'inibizione della via di segnale PI₃K/Akt. Inoltre, è stato identificato

il bersaglio diretto e primario della quercetina, la chinasi CK2, la cui attività è inibita dopo pochi secondi dall'aggiunta alle cellule del flavonoide. Considerando il rapido assorbimento della quercetina e la bassa tossicità linfocitaria, è giustificata la progettazione di studi clinici mirati a dimostrare l'uso potenziale della molecola nella chemioterapia adiuvante contro la LLC.

L'efficacia clinica dei prodotti a base di piante medicinali: generalità e dati recenti

Angelo A. Izzo

Dipartimento di Farmacia, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli Federico II, Napoli

Le piante medicinali rappresentano il fondamento di sistemi di cura tradizionali, quali la Medicina Tradizionale Cinese, la medicina Ayurvedica e la medicina Kampo e sono comunemente utilizzate nei paesi industrializzati, dove il loro utilizzo risulta spesso integrato a quello dei farmaci convenzionali. Secondo le stime più recenti riferite al mercato statunitense, per il tredicesimo anno consecutivo si è osservato un aumento della vendita di tali prodotti, e nel 2016 un aumento del 7,7% rispetto all'anno precedente. Di fronte ad un utilizzo così massiccio, risulta prioritario ottenere informazioni rigorose sull'efficacia di tali prodotti. L'efficacia per ogni singolo prodotto a base di piante medicinali deve essere accuratamente valutata e generalizzazioni del tipo "le piante medicinali sono efficaci" o, in alternativa, "le piante medicinali non sono superiori al placebo" non possono essere scientificamente accettate. Come per i farmaci di sintesi, l'efficacia clinica delle piante medicinali può essere determinata dall'analisi dei risultati degli studi clinici. Gli studi clinici randomizzati e controllati, specialmente se condotti in doppio cieco, rappresentano il metodo più rigoroso per stabilire l'efficacia delle piante medicinali. Tuttavia, i singoli studi clinici, anche se condotti in modo sufficientemente rigoroso, possono

fornire risultati diversi e contraddittori. È pertanto la totalità degli studi clinici, raccolti in revisioni sistematiche e metanalisi, che ci può fornire la più affidabile evidenza di efficacia clinica. Negli ultimi anni diverse revisioni sistematiche e metanalisi sono state pubblicate e sono pertanto disponibili dati aggiornati sull'efficacia dei rimedi a base di piante medicinali. Tuttavia, per la maggior parte di tali rimedi, esistono poche conclusioni definitive e generalmente, dalle revisioni sistematiche, emerge la necessità di condurre studi clinici più rigorosi. Diversi sono infatti i limiti metodologici degli studi clinici analizzati, come ad esempio il numero limitato di pazienti arruolati, la breve durata dei singoli studi, la variabilità nella dose utilizzata e, ultimo – ma non per importanza – l'inaccurata o l'assenza di informazione sul tipo di preparazione vegetale utilizzata e sulle sue caratteristiche (parte della pianta utilizzata, nome scientifico della pianta, metodo di estrazione e solvente utilizzato, standardizzazione e caratterizzazione fitochimica dell'estratto).

Tollerabilità e sicurezza di impiego dei nutraceutici ipocolesterolemizzanti

Arrigo F. G. Cicero

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Bologna

I nutraceutici ipolipemizzanti sono ampiamente utilizzati in popolazione generale, spesso senza il filtro di medici o altro personale sanitario. Si possono distinguere sulla base del meccanismo d'azione in 3 principali gruppi: inibitori dell'assorbimento del colesterolo intestinale, inibitori della sintesi del colesterolo epatico ed induttori dell'escrezione biliare del colesterolo. Al primo gruppo appartengono sostanze con scarsissima possibilità di tossicità sistemica, perché svolgono la loro azione a livello del lume intestinale (fitosteroli, fibre solubili, resine): i loro effetti collaterali sono principalmente gastrointestinali. I fitosteroli tendono a ridurre l'assorbimento

di vitamine liposolubili. Nei rarissimi casi affetti da sitosterolemia familiare vengono assorbiti a livello sistemico e causano ateromasia precoce. Il prototipo dell'inibitore della sintesi epatica del colesterolo è il riso rosso fermentato, il cui principio attivo (la monacolina K) ad alto dosaggio può causare gli stessi effetti collaterali delle statine (mialgie, miopatia). La miotossicità della monacolina K è dose-dipendente, quindi non deve essere associata a statine di sintesi. La monacolina K è un substrato del CYP450 (in particolare 3A4 e 2D6): l'utilizzo concomitante di inibitori enzimatici (succo di pompelmo, ciclosporina, niacina, fibrati, verapamil, warfarin) possono aumentare la concentrazione ematica di monacoline aumentando quindi il rischio di miotossicità. Da un punto di vista tossicologico è necessario che gli estratti contengano citrinina a dosaggi inferiori a 0.2 mcg/kg perché questo prodotto della fermentazione del riso rosso può causare nefrotossicità e genotossicità. Fra gli altri inibitori della sintesi del colesterolo, estratti di carciofo e bergamotto sembrano sicuri e ben tollerati, mentre gli estratti di aglio invecchiato possono causare gastrite ed allungamento del tempo di sanguinamento. L'induttore di escrezione del colesterolo prototipico è la berberina. Avendo una bassissima biodisponibilità orale causa prevalentemente effetti collaterali intestinali. Inibendo la glicoproteina P tuttavia può aumentare la biodisponibilità (e quindi la tossicità) di farmaci substrato di questa proteina, come la ciclosporina. Fra le sostanze con meccanismo d'azione misto, il tè verde può inibire l'assorbimento intestinale di ferro ed acido folico. Gli isoflavoni della soia possono alterare la funzionalità tiroidea e la fertilità, mentre i fitati della soia l'assorbimento intestinale di diversi minerali. In conclusione, per quanto il profilo di sicurezza dei nutraceutici ad azione ipolipemizzante sia globalmente elevato, pazienti fragili e sottoposti a trattamenti con range terapeutico ristretto dovrebbero assumerli

*Cicero AFG, Colletti A, Bajraktari G, Descamps O, Djuric DM, Ezhov M, Fras Z, Katsiki N, Langlois M, Latkovskis G, Panagiotakos DB, Paragh G, Mikhailidis DP, Mitchenko O, Paulweber B, Pella D, Pitsavos C, Reiner Z, Ray KK, Rizzo M, Sahebkar A, Serban MC, Sperling LS, Toth PP, Vinereanu D, Vrablik M, Wong ND, Banach M. Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Nutr Rev.* 2017 Sep 1; 75(9): 731-767. doi: 10.1093/nutrit/nux047.*

*Cicero AF, Colletti A. An update on the safety of nutraceuticals and effects on lipid parameters. *Expert Opin Drug Safety* 2018; In press.*

solo dietro prescrizione e controllo medico.

Fitovigilanza e aspetti di sicurezza di fitoterapici e integratori alimentari

Alfredo Vannacci

Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Firenze

La fitoterapia è la disciplina medica che utilizza le piante medicinali e i loro derivati per prevenire e curare le malattie. Secondo un'indagine ISTAT del 2013 il ricorso medio alla fitoterapia in Italia è del 1,9%, con alcune regioni che spiccano particolarmente, come ad esempio la Toscana. Secondo un'indagine della Agenzia Regionale di Sanità Toscana del 2009 infatti, se in regione le persone che dichiarano di aver fatto ricorso alla fitoterapia negli ultimi tre anni sono l'1,9% (in linea col dato nazionale), la prevalenza d'uso sale addirittura al 25% se si considerano i prodotti erboristici. Con la diffusione dell'utilizzo dei prodotti di origine vegetale, sono emerse anche le diverse problematiche associate a questi prodotti. Molti prodotti a base di piante medicinali sono infatti ancora oggi pubblicizzati come più sicuri perché "naturali" e vengono consigliati spesso proprio nelle situazioni in cui dovrebbero essere usati con maggior cautela, come la gravidanza, l'allattamento, l'età pediatrica e l'età geriatrica.

Per queste ragioni, in seno alla Farmacovigilanza, è nata la Fitovigilanza, una disciplina che si propone di valutare il rischio connesso all'uso dei fitoterapici e, attraverso il monitoraggio delle reazioni avverse, di aiutare a definirne la sicurezza. Tra tutti gli strumenti disponibili, quello che gioca un ruolo di primaria importanza è rappresentato dalla segnalazione spontanea, ovvero il report da parte di un operatore sanitario o di un cittadino del verificarsi di una reazione avversa

a un fitoterapico. Dal marzo 2002 è in particolare attiva una sorveglianza delle reazioni avverse da prodotti di origine vegetale coordinata dal Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'Agenzia Italiana del Farmaco e il Ministero della Salute. Il sistema di sorveglianza delle sospette reazioni avverse da prodotti di origine naturale è parallelo alla Rete Nazionale di Farmacovigilanza gestita da AIFA e raccoglie in una banca dati diversa e specifica le segnalazioni di eventi avversi. Nell'ambito di tale sistema è possibile classificare le segnalazioni pervenute in un determinato numero di categorie, tra le quali le principali sono:

- Utilizzo del prodotto in soggetti fragili (bambini, anziani, gravidanza etc)
- Reazioni idiosincrasiche e/o geneticamente determinate
- Presenza di principi attivi a marcata azione farmacologica
- Interazioni con la terapia farmacologica in atto
- Presenza di componenti naturali non dichiarati
- Presenza di adulteranti di sintesi
- Problematiche nel controllo di qualità

Il sistema di Fitovigilanza si basa pertanto sulla raccolta e valutazione di segnalazioni spontanee di sospette reazioni avverse insorte dopo l'assunzione/somministrazione di prodotti non registrati nella categoria dei farmaci, quali: vitamine e minerali, integratori alimentari, prodotti erboristici, prodotti omeopatici (in base al Decreto legislativo 219/2006), prodotti utilizzati in Medicina Tradizionali (come ad esempio quelli della medicina tradizionale cinese e ayurvedica), probiotici e altri prodotti non dotati di ATC.

Effetti indesiderati dei farmaci: dalla tossicologia pre-clinica alla farmacovigilanza (Giorno 13 aprile 2018, 9.00-11.00)

Verso la connessione tra evidenza pre-clinica e paziente

Gianni Dal Negro

London, United Kingdom

Nel settore farmaceutico, non sempre i *finding* evidenziati dagli studi regolatori permettono di valutare il meccanismo tossicologico né, soprattutto, la loro rilevanza per l'uomo. Per colmare il vuoto nella comprensione dei meccanismi che portano all'evento tossico, vengono utilizzati strumenti investigativi per produrre dati a complemento del dossier regolatorio. Infatti, *screening* tossicologici e attività investigative vengono condotti prima, durante e, talvolta, dopo gli studi regolatori pre-clinici previsti dalle linee-guida ICH al fine di definire la cosiddetta *Adverse Outcome Pathway* (AOP), ovvero quella serie di eventi che inizia con il primo contatto/interazione molecolare della sostanza tossica con l'ospite fino alla manifestazione tossicologica finale. La comprensione della rilevanza per l'uomo di un evento tossico osservato a livello pre-clinico ha un'importanza fondamentale nella valutazione del rischio e nel determinare l'eventuale progressione della sostanza nella fase di sperimentazione clinica. Questa necessità ha rappresentato lo stimolo maggiore alla ricerca e sviluppo di sistemi "umanizzati" nell'ultimo decennio. Nuovi *screening* e strumenti investigativi basati su cellule o tessuti di origine umana vengono continuamente esplorati, mentre le agenzie regolatorie dimostrano apertura nel considerare dati generati con questi nuovi approcci nella prospettiva di una loro possibile adozione futura per scopi regolatori. Tuttavia, nonostante questi

nuovi approcci sembrano promettenti nel riprodurre la pato-fisiologia umana e nel predire eventi indesiderati nell'uomo, la maggior parte di essi è ancora in una fase di sviluppo e caratterizzazione molto precoce. In questa presentazione verrà discusso lo stato dell'arte e le prospettive della tossicologia pre-clinica nel settore farmaceutico.

La tossicologia post-marketing: identificazione dei nuovi effetti indesiderati dei farmaci nella pratica clinica quotidiana

Domenico Motola

*Department of Medical and Surgical Sciences,
University of Bologna, Bologna*

La farmacovigilanza post-marketing rappresenta il sistema più economico e diffuso per la continua valutazione del profilo di sicurezza dei farmaci in commercio e per l'individuazione dei nuovi segnali di sicurezza.

Ciò è necessario in quanto la sperimentazione clinica pre-registrativa, per ragioni numeriche, etiche e temporali, non consente di individuare tutte le possibili reazioni avverse da farmaci, in particolare quelle rare che spesso sono anche quelle gravi e talvolta mortali.

La segnalazione spontanea è anche un obbligo di tipo normativo che, recependo direttive comunitarie, obbliga tutti gli operatori sanitari alla segnalazione spontanea di sospette reazioni avverse, estendendo questa possibilità anche ai cittadini/pazienti. Le segnalazioni spontanee, una volta verificate, vengono inserite nella Rete Nazionale di Farmacovigilanza e periodicamente riversate nella rete europea Eudravigilance. Lo scopo principale della segnalazione spontanea è quindi quello di individuare nuovi segnali d'allarme (associazioni tra farmaco e ADR precedentemente non note o poco studiate) da sottoporre alla valutazione dell'autorità europea (EMA) ai fini dell'adozione di apposite misure regolatorie, come ad

esempio la modifica del Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto fino alla revoca dell'AIC del medicinale coinvolto. Questa procedura di analisi e valutazione dei segnali è codificata dalle norme attualmente in vigore e prevede l'applicazione di metodi statistici ai dati di farmacovigilanza, in particolare il *Reporting Odds Ratio* e il *Proportional Reporting Ratio*, come misure di disproporzionalità.

I vari Stati Membri, le agenzie regolatorie nazionali e i Centri Regionali di Farmacovigilanza sono chiamati a contribuire a questo network europeo per il monitoraggio continuo della sicurezza dei farmaci ai fini di un uso più consapevole e sicuro dei medicinali nel primario interesse della salute dei pazienti.

Farmacovigilanza: il ruolo del Centro Antiveleni

Sarah Vecchio

Ser.D Biella, Servizio Dipendenze, Biella

Nell'ambito delle attività di farmaco e tossicovigilanza, i Centri Antiveleni (CAV) forniscono consulenze relative alle reazioni avverse da farmaci, probabili o sospette, e alle assunzioni incongrue di farmaci derivanti da errori terapeutici di prescrizione, dispensazione o somministrazione. Per quanto riguarda le reazioni avverse, generalmente si tratta di richieste da parte di medici o privati cittadini sul possibile nesso di causalità tra esposizione a farmaci tradizionali, prodotti erboristici o omeopatici ed eventi patologici. In altri casi è lo specialista tossicologo del CAV che, di fronte ad un determinato quadro clinico e approfondendo l'anamnesi farmacologica, pone il sospetto di ADR. I Centri Antiveleni, per la natura del servizio che svolgono, costituiscono un punto di osservazione privilegiato di

eventi quali reazioni avverse a farmaci ed errori terapeutici che si verificano sul territorio nazionale e regionale: la rilevazione di "eventi sentinella" e di aumenti di frequenza inattesi di reazioni avverse o errori terapeutici sono mansioni che i CAV normalmente svolgono come facenti parte delle loro funzioni.

Farmacovigilanza: quali le sfide future per l'azienda farmaceutica?

Lisa Stagi

Roche, Monza

La Farmacovigilanza consiste in tutte le attività finalizzate a valutare in maniera continuativa il rapporto beneficio/rischio dei farmaci e serve pertanto ad assicurare ai pazienti un continuo monitoraggio della sicurezza dei farmaci che assumono.

Conoscere meglio i farmaci significa infatti anche utilizzarli in modo appropriato e minimizzare i rischi collegati a possibili eventi avversi.

Queste attività presuppongono quindi la continua raccolta e valutazione di informazioni sugli effetti indesiderati associati ai trattamenti farmacologici, in un panorama reso sfidante dall'utilizzo di nuove tecnologie, dall'ingresso nella vita quotidiana della digitalizzazione e dalla possibilità di analizzare e avere a disposizione grandi volumi di dati.

Tutti questi fattori, uniti all'evoluzione del panorama normativo, impongono alle aziende un continuo aggiornamento dei processi e delle strutture interne.

L'intervento mira quindi ad approfondire questi differenti aspetti e le implicazioni del sistema di Farmacovigilanza in Italia e in Europa, dal punto di vista legislativo, organizzativo e di impatto sulla salute dei pazienti, unitamente all'evoluzione che le attività di farmacovigilanza stanno subendo all'interno dell'azienda farmaceutica.

Monitoraggio biologico negli ambienti di vita e di lavoro: sfide e prospettive future

(Giorno 13 aprile 2018, 9.00-11.00)

Monitoraggio biologico dell'esposizione occupazionale ed ambientale ad elementi metallici quale strumento di valutazione del rischio per la salute

Piero Lovreglio

Dipartimento Interdisciplinare di Medicina, Sezione di Medicina del Lavoro "E. C. Vigliani", Università di Bari, Bari

L'inquinamento da elementi metallici negli ambienti di lavoro e di vita, sebbene contenuto rispetto al passato, rappresenta a tutt'oggi un importante problema di salute pubblica, e il monitoraggio biologico si è dimostrato un valido strumento per la valutazione dell'esposizione dei lavoratori e della popolazione generale a questi inquinanti.

Negli ultimi anni sono state messe a punto nuove metodiche analitiche per il biomonitoraggio che consentono di misurare concentrazioni sempre più basse degli elementi metallici, in linea con la progressiva riduzione dei loro livelli di esposizione negli ambienti di lavoro e di vita. Peraltro, l'utilizzo di matrici biologiche alternative rispetto alle urine e al sangue, quale il condensato dell'aria esalata (EBC), ha anche consentito di individuare nuovi indicatori biologici di esposizione. La concentrazione del cromo nell'EBC, ad esempio, rappresenta un biomarcatore particolarmente utile per il monitoraggio dei composti insolubili del cromo VI e per misurare la dose dell'elemento metallico che raggiunge il polmone, organo bersaglio dell'effetto cancerogeno del cromo VI. Per il biomonitoraggio di alcuni elementi metallici come arsenico e cromo,

inoltre, risulta essenziale l'utilizzo della tecnica della speciazione che consente di misurare separatamente le diverse specie dell'elemento metallico. Per l'arsenico, ad esempio, la speciazione consente di distinguere le specie urinarie che originano dall'assorbimento dell'arsenico inorganico quali As^3 , As^5 e in parte MMA da quelle che possono avere origine sia dall'arsenico inorganico che da quello organico di origine alimentare, quale il DMA, e da quelle di sicura origine organica come l'arsenobetaina. Questa differenziazione appare essenziale per la stima del rischio per la salute in quanto solo l'arsenico inorganico risulta essere tossico e cancerogeno per l'uomo, mentre l'arsenobetaina e gli altri composti organici sono considerati sostanzialmente non tossici. La tecnica multielemento, infine, rappresenta un'altra metodica essenziale per il monitoraggio biologico dell'esposizione ad elementi metallici, in quanto consente una valutazione contemporanea dell'esposizione a più elementi metallici utilizzando un solo campione di urine. Questo può essere di particolare utilità sia nello studio dell'esposizione della popolazione residente in aree a rischio di inquinamento ambientale da più elementi metallici, sia per valutare l'esposizione multipla ad elementi metallici in ambienti di lavoro dove questa può essere presente, come ad esempio le fonderie.

In conclusione, i progressi nella messa a punto di nuove tecniche analitiche e la ricerca di nuovi indicatori biologici hanno reso il monitoraggio biologico degli elementi metallici uno strumento indispensabile per la valutazione dell'esposizione, in grado di fornire informazioni complementari rispetto al monitoraggio ambientale per la stima del rischio per la salute conseguente a questa esposizione.

**Aggiornamenti in tema di
monitoraggio biologico dei solventi****Silvia Fustinoni***Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità,
Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico e
Università degli Studi di Milano, Milano*

Il monitoraggio biologico dell'esposizione a solventi è iniziato negli anni '80, con la misura dei metaboliti principali nell'urina e nel sangue dei soggetti esposti in ambiente di lavoro come indici di esposizione. Tra questi possiamo citare il fenolo urinario per il benzene e l'acido ippurico urinario per il toluene. Questa pratica si è evoluta nel corso degli anni per rispondere alla richiesta di indici sempre più specifici e sensibili, necessari per il monitoraggio di esposizioni che si sono progressivamente abbassate, come risposta alle evidenze scientifiche e alle imposizioni legislative per la tutela della salute nei luoghi di lavoro. In particolare per alcuni metaboliti si sono dimostrate le interferenze derivanti dalla dieta, dalle abitudini personali, tra cui l'abitudine al fumo di tabacco, dal metabolismo di amminoacidi o altre molecole endogene. Per questo motivo l'attenzione dei ricercatori si è spostata progressivamente su indici biologici specifici, spesso rappresentati da metaboliti secondari dei solventi o sulla misura delle sostanze non metabolizzate. Inoltre molti studi si sono focalizzati sulla possibilità di utilizzare l'urina, matrice biologica abbondante, che non necessita pratiche invasive per la sua raccolta ed è facile da conservare. Oggi, il monitoraggio biologico dell'esposizione a solventi negli ambienti di lavoro e la successiva valutazione del rischio possono essere affrontati utilizzando la lista degli indici biologici proposti dalla statunitense ACGIH con i relativi valori limite biologici BEL (include 30 diverse sostanze), oppure dalla tedesca DFG e i relativi valori

limite BAT, di riferimento BG, valori tecnici guida BW e equivalenti per le sostanze cancerogene EKA (include 36 sostanze). Per il benzene sono raccomandati l'acido t,t-muconico, l'acido S-fenilmercapturico e il benzene urinario; per il toluene sono raccomandati l'o-cresolo e il toluene urinario.

Per il monitoraggio dell'esposizione in ambiente di vita, pratica sempre più applicata per valutare l'esposizione ad inquinanti che derivano da sorgenti quali, ad esempio, il traffico e la presenza di siti industriali, ma anche per stabilire valori di riferimento in assenza di esposizione occupazionale, la necessità di disporre di indicatori sensibili e specifici è ancora più sentita. Per questo è necessario adottare tecniche analitiche che possano utilmente distinguere i segnali generati dalle molecole di interesse da quelle di centinaia di altre molecole presenti nei fluidi biologici (specificità analitica), e che siano in grado di misurare concentrazioni molto piccole, tipicamente alcuni ordini di grandezza inferiori a quelli in cui molte molecole fisiologiche sono presenti (sensibilità analitica). Negli anni queste tecniche hanno privilegiato l'applicazione della spettrometria di massa, che consente di identificare le molecole sulla base degli spettri di massa, ovvero l'insieme degli ioni generati dalla frammentazione molecolare, e che viene considerato alla stregua di un'impronta digitale della molecola stessa. Questa evoluzione delle conoscenze e della tecnologia ci consente oggi di fronteggiare le problematiche poste dalla misura di concentrazioni molto piccole in fluidi biologici e dunque di studiare la relazione tra esposizione dell'ambiente e dose interna e tra questa e gli effetti per la salute.

Valutazione del rischio da nanomateriali: possibile uso del monitoraggio biologico nella valutazione dell'esposizione

I. Iavicoli, V. Leso

Dipartimento di Sanità Pubblica, Sezione di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

Il rapido progresso compiuto dalla ricerca nel campo dello sviluppo e dell'applicazione delle nanotecnologie ha offerto l'opportunità di produrre nanomateriali ingegnerizzati caratterizzati da peculiari proprietà fisico-chimiche. Queste caratteristiche hanno permesso ai nanomateriali di essere impiegati in differenti settori produttivi tra cui l'elettronica, la chimica, il settore biomedico, tessile, cosmetico e alimentare. Tale diffusione ha determinato il costante aumento dei livelli di esposizione della popolazione generale a nanomateriali e, in particolare, dei lavoratori impiegati in tali settori, facendo emergere in modo sempre più pressante l'esigenza di valutarne adeguatamente i rischi (Leso e coll. 2017). Secondo la definizione di rischio generalmente accettata in ambito tossicologico, tale valutazione è funzione delle intrinseche proprietà pericolose delle sostanze chimiche e della relativa probabilità di esposizione. Pertanto, valutare l'esposizione ai nanomateriali appare un elemento essenziale a tale scopo. Tuttavia, il monitoraggio ambientale di xenobiotici di dimensione nanometrica trova degli ostacoli operativi nella mancanza di strategie condivise e standardizzate di campionamento, anche in relazione alla difficoltà di definire quali parametri metrologici, ad es. la massa, il numero di particelle, l'area di superficie delle stesse, sia necessario misurare in quanto maggiormente rappresentativi della reattività biologica dei nanomateriali e quindi di una "dose di esposizione efficace" in termine di possibili effetti

avversi. In tale scenario, il monitoraggio biologico appare essenziale al fine di ottenere informazioni complementari a quelle fornite dal monitoraggio ambientale, tenendo in considerazione tutte le possibili vie di assorbimento dei nanomateriali e le caratteristiche individuali dei soggetti esposti. Dati preliminari, ottenuti in studi sul campo (Pelclova e coll. 2015) e *in vivo* (Iavicoli e coll. 2014), hanno dimostrato come nel caso di esposizione a nanomateriali ingegnerizzati a composizione metallica o a base di ossidi di metallo, ad es. nanoparticelle di argento, d'oro o di biossido di titanio, il dosaggio del contenuto del metallo elementare in matrici biologiche facilmente accessibili, come sangue ed urine, possa essere considerato un utile indicatore biologico di dose interna, in seguito ad esposizioni inalatorie, cutanee e attraverso la via gastrointestinale. Tuttavia, la definizione e validazione di possibili marcatori biologici di esposizione, nonché la corretta interpretazione dei risultati, necessitano di un'approfondita comprensione della tossico-cinetica e dinamica dei nanomateriali una volta assorbiti nell'organismo, anche in relazione alle loro proprietà fisico-chimiche, intrinseche o acquisite nel contatto con i diversi sistemi biologici. Considerando le dosi estremamente elevate frequentemente impiegate in contesti sperimentali, futuri studi dovranno valutare la validità di tali indicatori in situazioni di esposizione a dosi inferiori e per più lunghi periodi di trattamento, maggiormente rappresentativi dei reali scenari espositivi riscontrabili negli ambienti di vita generale e di lavoro. Un'adeguata valutazione della relazione dose-risposta potrebbe permettere al monitoraggio biologico di fornire indicazioni, non solo in merito alle dosi assorbite, ma anche sui possibili rischi per la salute di soggetti esposti a livello individuale e/o di gruppo. Pertanto ulteriori studi appaiono necessari per validare

tali possibili marcatori di esposizione ed eventualmente definire appropriati protocolli di monitoraggio biologico da includere in programmi di sorveglianza sanitaria per i lavoratori esposti. Questo permetterà di ottenere informazioni utili alla valutazione del rischio, ma, al tempo stesso, di verificare l'efficacia di strategie di prevenzione e protezione adottate per la tutela della salute dei lavoratori esposti.

Indicatori urinari di danno ossidativo agli acidi nucleici

Roberta Andreoli

Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma, Parma

I principali bersagli macromolecolari delle specie reattive dell'ossigeno sono gli acidi nucleici, i lipidi e le proteine. Le modificazioni di questi *target* e la loro successiva degradazione enzimatica e non-enzimatica portano alla formazione di numerosi prodotti: basi ossidate dagli acidi nucleici e dal pool dei nucleotidi, aldeidi provenienti da processi di perossidazione lipidica, aminoacidi ossidati dalle proteine. Tra le basi degli acidi nucleici la guanina è quella più suscettibile a reagire con le specie reattive, in particolare quelle dell'ossigeno, e l'ossidazione avviene principalmente in posizione 8. A seconda della matrice e del tipo di trattamento a cui si sottopone il campione da analizzare, le forme in cui è possibile determinare l'ossidazione della guanina sono prevalentemente tre: 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG), specifica di un danno ossidativo subito dalla guanina contenuta nel DNA, 8-idrossiguanosina (8-oxo-Guo), specifica di un danno ossidativo subito dalla guanina contenuta nell'RNA e 8-idrossiguanina (8-oxo-Gua), che rispecchia un danno ossidativo subito dalla guanina presente nel pool dei nucleotidi, nell'RNA o nel DNA. Se dosati nelle urine, le concentrazioni di questi indicatori rappresentano la quota del danno

ossidativo subito dagli acidi nucleici e dal pool dei nucleotidi, ma che l'organismo è stato in grado di riparare spontaneamente o a seguito dell'attivazione di specifici meccanismi di riparazione esistenti (BER, MMR, ecc). L'utilizzo di tecniche analitiche che permettano la determinazione simultanea di questi tre indicatori di danno ossidativo consente una maggior caratterizzazione sia dei meccanismi di riparo attivati dall'organismo, sia una stima della loro efficienza. Recentemente sono state osservate associazioni tra questi indicatori, in particolare l'8-oxo-dG, e alcune patologie (diabete di tipo 2, l'obesità, tumore al colon e alla mammella) ed esposizioni ad inquinanti ambientali e occupazionali (benzene e idrocarburi policiclici aromatici).

Trattandosi di indicatori di effetto, gli indicatori di danno ossidativo alla guanina sono aspecifici e, per una corretta interpretazione dei meccanismi d'azione e delle possibili associazioni con agenti tossici presenti a bassi livelli di concentrazione, particolare attenzione deve essere posta alla caratterizzazione dei diversi fattori di confondimento, come abitudini voluttuarie, copresenza di più patologie, differenze anagrafiche o socio-economiche; alla scelta e identificazione dei gruppi utilizzati come controllo; alle problematiche relative alle metodiche analitiche utilizzate per la loro determinazione.

L'esposoma: linea di ricerca obbligata nelle Scienze Mediche Occupazionali e Ambientali

G. De Palma, M. Paganelli, P. Apostoli

Dipartimento Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica, Sezione Sanità Pubblica e Scienze Umane, Brescia

La decodifica del genoma umano ha permesso non solo l'acquisizione di importanti conoscenze sul nostro patrimonio genetico, ma ha soprattutto comportato una svolta metodologica: con

la genomica infatti nascono le “omics”, un nuovo modo di produrre sapere scientifico a partire da raccolte di dati sistematici ed organizzati di dimensioni sempre maggiori. L'esposomica rappresenta un'estensione di questo metodo allo studio delle esposizioni ambientali ed occupazionali: l'obiettivo è idealmente la decodifica delle molteplici esposizioni a cui un individuo è sottoposto, da mettere in relazione con altri “omics” (trascrittomica, proteomica, epigenomica) per meglio caratterizzare ed interpretare gli effetti sempre più precoci sulla salute umana ed elaborare strategie preventive sempre più efficaci, a livello di gruppi sempre più ristretti della popolazione, sino al singolo individuo. La caratterizzazione dell'esposoma costituisce dunque il nucleo imprescindibile della futura prevenzione “di precisione”. Dall'intuizione dell'esposoma, risalente ai primi anni 2000, si avanza oggi verso la sua formalizzazione mediante studi promossi e condotti da prestigiosi centri di ricerca.

La Medicina del Lavoro è inevitabilmente destinata ad essere coinvolta da tali

sviluppi; il Medico del Lavoro possiede infatti gli strumenti per qualificare e quantificare le esposizioni: le tecniche proprie dell'igiene industriale, della psicologia del lavoro e dell'ergonomia possono essere opportunamente adattate per un utilizzo che superi gli stretti ambiti occupazionali; possiede inoltre la conoscenza specialistica dei contesti espositivi occupazionali, dei rischi specifici e delle patologie che possono essere messe in relazione con i diversi fattori di rischio occupazionali e non.



Siamo lieti di informarvi che dallo scorso anno SITOX è operativa anche sui principali canali social: Facebook  e Twitter 

Potete seguire le nostre attività su questi canali:

Facebook: <https://www.facebook.com/societa.tossicologia.sitox/>

Twitter: <http://twitter.com/sitoxita>

Vi chiediamo di sostenere le attività di comunicazione di SITOX, mettendo mi piace alla pagina Facebook, seguendo il profilo Twitter e ricondividendo i post che ritenete interessanti per i vostri contatti, in modo da ottenere maggior visibilità per le attività di comunicazione della Società.

SITOX Informa è scaricabile online.

Visita il nostro sito www.sitox.org

SITOX INFORMA

Periodico della Società Italiana di Tossicologia

Fondata nel 1967

Riconosciuta con DPR 16/05/1972, n. 376 - C.F.: 96330980580

Iscritta Registro Persone Giuridiche Prefettura di Milano n. 3512 pag. 606 vol. II

Anno XXI n. 3 - Dicembre 2018

Direttore Responsabile: Sarah Vecchio

Comitato Editoriale: Salvatore Bianco, Claudio Colosio, Ivano Eberini, Annarita Meneguz, Marco Pivato, Costanza Rovida

Segreteria Editoriale: Ida Ceserani, M. Elena Scamoni

CONSIGLIO DIRETTIVO

Presidente: Corrado Lodovico Galli

Presidente Eletto: Orazio Cantoni

Consiglieri: Guido Mannaioni, Angelo Moretto, Michele Navarra, Emanuela Testai, Sarah Vecchio, Barbara Viviani

Segretario: Francesca Maffei

Past President: Patrizia Hrelia

Sede Legale & Sede Operativa:

Via Giovanni Pascoli, 3 - 20129 Milano

Tel 02 29520311 - Fax 02 700590939

E-mail: sitox@segr.it

Sito Web: www.sitox.org

Impaginazione e stampa:

RBS graphic productions S.r.l. - Torino

SITOX Informa - Registrazione del Tribunale di Milano, N. 332 del 31.05.97