

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

### Indice dei simposi:

#### Ambiente e salute

- Esposizione ambientale a composti neurotossici: impatto sul neuro-sviluppo dei bambini in età scolare  
*A. Pino, O. Senofonte* ..... pag. 2
- Il riciclo delle plastiche: problemi e prospettive  
*M. R. Milana*..... pag. 3

#### Nuovi approcci allo studio della tossicologia

- Nuovi approcci per lo studio della tossicità dello sviluppo  
*E. Menegola, R. Bacchetta, F. Di Renzo*..... pag. 3
- Ottimizzazione e riduzione della sperimentazione animale mediante SPILLO-PBSS: un innovativo metodo *in silico* 3D per l'individuazione di proteine bersaglio di agenti tossici su scala proteomica  
*A. Di Domizio*..... pag. 4
- Integrazione di test di neurotossicità *in vitro* con modellizzazione tossicocinetica *in silico*: studio dei glicol-eteri  
*E. Reale*..... pag. 5
- New OECD document on good *in vitro* method practises (GIVIMP) for the development and implementation of *in vitro* methods  
*A. Bal-Price, G. Bowe*..... pag. 6

#### La sperimentazione animale in tossicologia

- Lo zebrafish come modello sperimentale: nuove frontiere nella tossicologia molecolare e nell'ecotossicologia  
*F. Maradonna, O. Carnevali*..... pag. 6
- L'uso del minipig in tossicologia: un modello di non-rodente di rilevanza riconosciuta  
*C. Longobardi, S. Venturella*..... pag. 7
- Spera le ragioni della ricerca: la ricerca va a scuola  
*A. Wirz* ..... pag. 8
- Abbiamo ancora bisogno della sperimentazione animale? Riesame della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici  
*G. Grignaschi*..... pag. 9

#### Test innovativi per la valutazione della sicurezza *in vitro* e microbiologica dei prodotti cosmetici

- Un nuovo approccio per la valutazione della sicurezza dei prodotti cosmetici mediante combinazione di metodi *in vitro* e *in vivo*  
*R. Vicini, A. Buzzella, G. Mazzini, C. Angelinetta, E. Regola, F. Bianchi, O. Pastoris*..... pag. 10

- Sviluppo di un metodo alternativo per la valutazione *in vitro* del potenziale sensibilizzante  
*A. Buzzella, R. Vicini, G. Mazzini, C. Angelinetta, O. Pastoris*..... pag. 11
- Evoluzione dei nuovi sistemi conservanti e verifica della loro efficacia secondo la normativa UNI EN ISO 11930:2012  
*V. Cattaneo, M. Foppiani, C. Angelinetta, O. Pastoris*..... pag. 12

#### Modelli cinetici in tossicologia

- Impiego dei test di fenotipizzazione dei citocromi epatici *in vivo* per predire il rischio di reazioni avverse nell'uomo  
*R. Padrini*..... pag. 14
- La sfida del "Think-Exposure-First!": metodi predittivi applicati alla valutazione del prodotto Agrochimico  
*M. Corvaro*..... pag. 15

#### Sfide nella valutazione del rischio da prodotti fitosanitari

- La durata dell'esposizione: informazione negletta nella valutazione del rischio da pesticidi  
*C. Colosio, F. M. Rubino*..... pag. 15
- Uso dei dati epidemiologici nella definizione del rischio  
*E. Negri, C. La Vecchia*..... pag. 16
- Neurotossicità dello sviluppo  
*A. Terron*..... pag. 18
- Nano Fitofarmaci: un problema emergente  
*I. Iavicoli, V. Leso*..... pag. 18
- Uso di matrici non convenzionali per il monitoraggio biologico dell'esposizione a pesticidi  
*S. Fustinoni*..... pag. 20

#### Approcci metodologici multidisciplinari per la valutazione della sicurezza dei prodotti fitosanitari

- Approcci specifici e multidisciplinari per la valutazione della sicurezza di prodotti fitosanitari nelle colture risicole Europee: conclusioni da un workshop ad *hoc*  
*M. Corvaro, G. Azimonti, R. Cabella, G. Meregalli, M. Rubbiani*..... pag. 21
- La ricerca sui contaminanti ambientali nella tossicologia del XXI secolo: il caso del glifosato  
*F. Belpoggi, S. Panzacchi, D. Mandrioli, I. Menghetti, F. Gnudi, F. Manservigi*..... pag. 22

## **Ambiente e salute** **(Giorno 11 aprile 2018, 17.00-18.30)**

### **Esposizione ambientale a composti neurotossici: impatto sul neuro-sviluppo dei bambini in età scolare**

**Anna Pino, Oreste Senofonte**  
*Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Numerose ricerche hanno dimostrato il rischio per la salute in età pediatrica derivante da esposizione a metalli neurotossici come piombo, mercurio, cadmio, manganese ed arsenico e della loro capacità di accumularsi in organi target. La maggior parte dei metalli attraversa la placenta e la barriera ematoencefalica, determinando effetti sul neuro-sviluppo del feto e del bambino, in quanto il sistema nervoso in via di formazione risulta più vulnerabile nei confronti dell'azione tossica. Studi su bambini residenti in aree esposte a metalli hanno inoltre dimostrato effetti sulle funzioni cognitive e comportamentali dovute non solo ad un'esposizione ambientale, ma anche ad altri fattori quali stili di vita, stato socio economico, livello culturale, etc. Obiettivo dello studio è definire l'esposizione a metalli con proprietà neurotossiche in fluidi e tessuti di soggetti in età evolutiva (6-12 anni) residenti nei comuni di Taranto e Statte, al fine di individuare eventuali difformità di esposizione e valutare le possibili associazioni con deficienze nella sfera neuro-comportamentale e cognitiva. Circa 300 bambini sono stati arruolati in scuole dislocate in 5 sotto-aree a differente esposizione (distanza crescente dalla zona industriale): Tamburi, Statte, Paolo VI, Taranto, Talsano. Campioni di sangue,

urine e capelli sono stati analizzati per la determinazione di Arsenico (As), Cadmio (Cd), Manganese (Mn), Mercurio (Hg), Piombo (Pb) e Selenio (Se) nelle idonee matrici biologiche. La determinazione di As, Cd nelle urine, Pb e Se nel sangue, Mn nei capelli è stata eseguita con spettrometro di massa; il Hg nei capelli è stato determinato con il metodo normato US EPA 7473 mediante DMA 80. La separazione delle diverse specie di As è stata effettuata mediante cromatografo ionico combinato con spettrometro di massa per la quantificazione. La valutazione cognitiva e comportamentale è stata esaminata mediante somministrazione di test e questionari ai bambini, ai genitori e agli insegnanti: batterie di test WISC-IV, CANTAB (per i bambini), le batterie CBCL, SRS (per genitori ed insegnanti), test SPM per la madre. Dai risultati ottenuti si evidenzia che le concentrazioni dei metalli sono generalmente all'interno dei valori di riferimento riscontrati per altre popolazioni pediatriche. Per As, il 93% del totale nei campioni analizzati è dovuto alla As-Betaina, specie che indica una esposizione di origine alimentare (consumo di pesce) e senza effetti tossicologici. La concentrazione di Cd è risultata, per 125 soggetti, compresa all'interno dell'intervallo di attenzione tra HBM-I e HBM-II. Si evidenzia una riduzione del QI rilevata con la batteria WISC, aumento di iperattività e tratti psicopatologici (ansia e depressione), riduzione dell'attenzione e alterazione del comportamento sociale (batterie CANTAB, CBCL e SRS) nelle aree di Tamburi, Paolo VI, Statte rispetto alle aree a maggiore distanza dall'area industriale. Un'associazione dei punteggi di QI, test

di iperattività, disturbi dell'attenzione e del comportamento sociale è stata rilevata in special modo con il piombo e con i fattori socio-economico-culturali. Per quanto riguarda la dieta è stato osservato il ruolo protettivo degli elementi contenuti in alcuni tipi di alimenti. Il ruolo dell'esposizione ambientale ad agenti neurotossici appare pertanto determinante degli effetti osservati nell'area di Taranto, pur non essendo possibile, con i dati attuali, individuare specifiche sorgenti di esposizione.

## **Il riciclo delle plastiche: problemi e prospettive**

**Maria Rosaria Milana**

*Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La situazione di emergenza ambientale da rifiuti di materie plastiche è un fenomeno universalmente noto. Molte materie plastiche possono essere recuperate e riciclate per ulteriori cicli di vita come beni utili, con risparmio economico e salvaguardia ambientale. Ogni nuovo campo di impiego della plastica riciclata deve però assicurare che il nuovo prodotto non sia dannoso per l'uomo o il suo habitat. Un esempio tipico è il settore dei materiali e oggetti a contatto con alimenti (MOCA) dove esistono criteri specifici elaborati da EFSA per la *safety evaluation* delle plastiche riciclate, in particolare per il PET, plastica costituente le bottiglie e le vaschette monouso di largo uso e impatto ambientale. I criteri si basano sulla dimostrazione a priori che il processo di riciclo può ricondurre il bene alle stesse condizioni di sicurezza del primo impiego. Dopo applicazione di un test sperimentale (*challenge test*) per caratterizzare la

“capacità decontaminativa” del processo industriale, vengono applicati parametri di confronto per verificare se il potenziale residuo dopo decontaminazione sia pericoloso. Ciò viene effettuato paragonando i residui con un livello “safe” stabilito su base tossicologica e calibrato rispetto al tipo di consumatore (neonati, bambini, adulti). Il sistema di *safety evaluation* poggia su assunzioni di *worst case* estremamente conservative ai fini della protezione della salute umana. Accanto al sistema legale della UE e degli USA, per i MOCA di plastica esiste purtroppo un mercato illegale di riciclo di plastiche che coinvolge fra l'altro settori quali i giocattoli, nei quali non raramente vengono reperiti contaminanti non facilmente ascrivibili ad un processo produttivo, ma derivanti da riciclo di materiale di origine non controllata. I sistemi di controllo analitico possono prevenire esposizioni del consumatore, specialmente se bambino, a sostanze potenzialmente pericolose per la sua salute

## **Nuovi approcci allo studio della tossicologia**

**(Giorno 11 aprile 2018, 9.00-10.30)**

### **Nuovi approcci per lo studio della tossicità dello sviluppo**

**Elena Menegola, R. Bacchetta, F. Di Renzo**

*Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali, Università degli Studi di Milano, Milano*

Data la crescente spinta alla sostituzione (*replacement*) e riduzione (*reduction*) degli animali ad uso sperimentale e al miglioramento (*refinement*) delle procedure applicate a studi di tossicità

dello sviluppo mirate alla valutazione del rischio, l'uso di modelli alternativi è in valutazione da decenni.

Anche se sono stati proposti un certo numero di metodi alternativi *in vitro*, la maggior parte non viene considerata adeguata ai fini della sostituzione e il loro utilizzo è limitato in approcci meccanicistici. Lo sviluppo embrionale, infatti, si basa sulla complessa interazione tra cellule, tessuti ed organi per attivare un processo che prende il nome di induzione embrionale. Di conseguenza, solo i modelli che utilizzano embrioni interi possono mimare la complessità biologica embrionale. Considerando che dalla fecondazione allo stadio filotipico tutti gli embrioni di Vertebrato condividono i *pathways* di sviluppo e che embrioni che si sviluppano tramite fecondazione esterna non sono considerati, fino allo stadio di autosufficienza, soggetti sperimentali, è stato proposto negli ultimi anni l'uso di embrioni di Vertebrato non Mammifero (il pesce Teleosteo *Danio rerio*, zebrafish, e l'Anfibio *Xenopus laevis*). Inoltre, recentemente anche i Tunicati (gruppo di invertebrati che rappresenta il *sister group* dei Vertebrati) sono stati proposti come specie alternative non regolamentate dall'attuale decreto legislativo. Infine, l'uso di tecniche di genomica e metodi *in silico* sono attualmente al vaglio per supportare moderni approcci di tossicità dello sviluppo.

**Ottimizzazione e riduzione della sperimentazione animale mediante SPILLO-PBSS: un innovativo metodo *in silico* 3D per l'individuazione di proteine**

## **bersaglio di agenti tossici su scala proteomica**

**Alessandro Di Domizio**

*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano  
SPILLOproject, Paderno Dugnano*

L'individuazione dei target proteici degli xenobiotici finalizzata alla comprensione dei meccanismi biomolecolari alla base della tossicità riveste un'importanza fondamentale in tossicologia. Le strategie di screening sperimentali spesso, però, richiedono tempi lunghi e l'utilizzo di ingenti risorse economiche, nonché il ricorso alla sperimentazione animale.

Un conveniente supporto ai tradizionali test *in vitro* e *in vivo* può essere oggi rappresentato dalle più recenti tecniche *in silico*, favorite sia dalla crescente disponibilità di dati, i cosiddetti "big data" biologici, sia dal continuo aumento della potenza di calcolo dei calcolatori.

Verrà presentato il **software innovativo SPILLO-potential binding sites searcher (SPILLO-PBSS)**<sup>1</sup>, che, con risorse e tempi di calcolo minimi, è in grado di **analizzare in 3D** (approccio structure-based) **l'intero proteoma strutturale umano** disponibile depositato nel *Protein Data Bank* (38500+ strutture proteiche, in continuo aumento) e di individuare i potenziali target proteici degli xenobiotici utili per **spiegare e/o prevedere** a livello biomolecolare le **cause della tossicità**.

SPILLO-PBSS è uno strumento **totalmente diverso dagli altri metodi esistenti**: la sua unicità e punto di forza consistono nel riuscire ad indentificare i potenziali siti di legame (degli xenobiotici) sulle proteine anche se essi sono

fortemente distorti e/o apparentemente inaccessibili (es. completamente chiusi, molto interni, occupati) agli xenobiotici stessi, rispetto ad una conformazione ideale per il *binding*. In questo modo esso è in grado di identificare target **proteici** (*off-target*, nel caso specifico di farmaci) **non individuabili dai software tradizionali**.

Inoltre, SPILLO-PBSS offre la possibilità di eseguire analisi di proteomi strutturali appartenenti ad organismi diversi dall'*Homo sapiens* (es. ***Mus musculus***, ***Rattus norvegicus***, ecc.) e di valutare in modo razionale la trasferibilità dei risultati dall'*Homo sapiens* al modello animale e viceversa. Ciò si traduce in una migliore valutazione dell'attendibilità dei modelli animali usati nei test sugli xenobiotici ed in una progettazione più mirata e consapevole di tali esperimenti, in accordo con un contesto legislativo che tende a **ridurre la sperimentazione animale**.

Verranno presentati esempi applicativi in cui SPILLO-PBSS si è dimostrato particolarmente efficace nella soluzione di problemi riguardanti la tossicità di farmaci e, più in generale, di xenobiotici

### **Integrazione di test di neurotossicità *in vitro* con modellizzazione tossicocinetica *in silico*: studio dei glicol-eteri**

**Elena Reale**

*Institut de Santé au Travail (IST), Lausanne, Switzerland*

#### **Introduzione:**

I glicoleteri (GE) sono solventi organici ampiamente utilizzati in vari settori professionali. Tra di essi, l'etilene glicol metil etere (EGME) è l'unico GE ad

essere riconosciuto per i suoi effetti di depressione del sistema nervoso centrale (SNC) nell'uomo, con fenomeni di tolleranza tipici dei solventi organici. Per altri GE, sintomi di depressione del SNC sono stati osservati principalmente in animali da laboratorio, ma i dati non sono sufficienti ad arrivare a delle conclusioni per l'uomo. La nostra ipotesi è che i glicoleteri possano essere neurotossici per l'uomo a concentrazioni spesso misurate nell'aria di ambienti di lavoro.

#### **Metodo:**

Attraverso studi *in vitro* su un modello 3D di cervello di ratto, abbiamo ottenuto la concentrazione senza effetto avverso osservabile (acronimo in inglese: NOAEC) per la tossicità neuronale di tre GE: il propilene glicol metil etere (PGME), il propilene glicol butil etere (PGBE) e l'EGME, come controllo positivo. Inoltre, lo sviluppo di un modello matematico tossicocinetico su base fisiologica (acronimo in inglese, PBK o PBTK) per il PGME ci ha permesso di calcolare la concentrazione di PGME nell'aria necessaria a produrre concentrazioni cerebrali pari alla NOAEC.

#### **Risultati e conclusioni:**

La NOAEC più bassa è stata osservata per il PGBE, che dunque risulta essere potenzialmente tossico per il cervello umano; il PGME è probabilmente non neurotossico a concentrazioni pari al valore limite di esposizione professionale vigente; infine, l'EGME non ha avuto effetti neurotossici a nessuna delle concentrazioni studiate. Ciò potrebbe suggerire che il suo metabolita principale, l'acido metossiacetico, conosciuto per la sua tossicità sullo sviluppo embrionale e sulla riproduzione, potrebbe essere

responsabile anche della nota neurotossicità dell'EGME.

### **New OECD document on good in vitro method practises (GIVIMP) for the development and implementation of in vitro methods**

**A. Bal-Price, G. Bowe**

*European Commission, Joint Research Centre (JRC), Ispra (VA)*

In vitro data need to be of high scientific relevance and quality, reproducible and internationally accepted if used in a regulatory context. Therefore, recently, a guidance document (GD) on Good In vitro Method Practices (GIVIMP) has been developed. It should be applied for the development and implementation of in vitro methods for regulatory use in human safety assessment aiming at reducing the uncertainties in cell and tissue-based in vitro method derived predictions.

The development of the GIVIMP guidance is coordinated by the European validation body EURL ECVAM and has been accepted on the work plan of the OECD test guideline programme as a joint activity between the Working Group on Good Laboratory Practice (GLP) and the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme (WNT). The GIVIMP GD is divided into 10 sections covering: (1) Roles and responsibilities, (2) Quality considerations, (3) Facilities (4) Apparatus, material and reagents, (5) Test systems, (6) Test and reference/control items, (7) Standard operating procedures (SOPs), (8) Performance of the method, (9) Reporting of results, (10)

Storage and retention of records and materials.

The scope of the GIVIMP document includes the principles of good cell culture practice (GCCP) for the greater international harmonization, standardization, and rational implementation of laboratory practices. GCCP principles have to be strictly applied to in vitro systems to deliver robust cellular models for toxicity testing. Failure to adopt GCCP principles in laboratories significantly increases the risk of generating erroneous data as well as risking worker health issues and legal liabilities.

### **La sperimentazione animale in tossicologia**

**(Giorno 11 aprile 2018, 15.00–17.00)**

#### **Lo zebrafish come modello sperimentale: nuove frontiere nella tossicologia molecolare e nell'ecotossicologia**

**F. Maradonna, O. Carnevali**

*Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

Negli ultimi anni, lo Zebrafish (*Danio rerio*) ha assunto un ruolo predominante in diversi ambiti scientifici, non solo nel campo della ricerca di base, ma anche per gli studi comportamentali e tossicologici, la patogenesi di alcuni batteri, i disordini neurodegenerativi, la ricerca farmaceutica, l'oncologia e le patologie ereditarie e congenite. Tra i motivi che hanno fatto sì che crescesse l'interesse verso questo modello sperimentale, ci sono: il suo basso costo, la facilità di mantenimento e allevamento in cattività,

uno sviluppo embrionale molto veloce ed un ciclo riproduttivo relativamente breve che permette l'esecuzione della sperimentazione in tempi ottimali e, non da ultima, la sua somiglianza genetica con l'uomo (>75% geni omologhi). Immediatamente dopo la fecondazione, l'embrione di zebrafish ha una chiarezza ottica senza rivali, che consente la tracciatura visiva dei singoli destini cellulari durante l'organogenesi. La sua trasparenza, associata alla comprensione dettagliata dei processi di sviluppo, consentono eleganti manipolazioni, che lo rendono un modello eccezionale per gli studi di Biologia dello Sviluppo. In momenti precisi, singole cellule o cluster di cellule possono essere rimosse da specifici campi anatomici dell'embrione e trasferiti in altri siti a chiarire i processi che controllano la determinazione del destino cellulare e rivelare quando il destino di determinati tipi di cellule sia specificato in modo irreversibile. Costrutti di DNA o RNA possono essere facilmente microiniettati negli embrioni a livello di 1 o di 2 cellule permettendo di analizzare gli effetti dell'espressione genica transitoria. La creazione di linee mutanti di zebrafish è risultata uno strumento importantissimo in grado di chiarire il ruolo di specifici geni nell'induzione di patogenesi causate dall'esposizione a sostanze tossiche. L'uso di zebrafish doppio o triplo mutante permette di chiarire le interazioni di gruppi di geni, in modo più efficiente ed economico rispetto a quanto lo consentano i roditori. Numerose pubblicazioni scientifiche mostrano come negli ultimi anni lo zebrafish si sia rivelato un modello sperimentale ottimo anche per gli studi di tossicologia della riproduzione, sia *in*

*vivo* che *in vitro*. Nel nostro laboratorio, diversi studi sono stati condotti rivelando gli effetti negativi dell'esposizione cronica agli ftalati, una categoria piuttosto eterogenea di composti di sintesi utilizzati come plastificanti, sul successo riproduttivo della specie. I risultati mostrano che l'esposizione, oltre a modulare l'espressione dei geni coinvolti nella riproduzione, ha un effetto transgenerazionale, e quindi grazie alla capacità di indurre modificazioni epigenetiche, gli effetti degli inquinanti sono trasmissibili dai genitori alle generazioni successive. Inoltre, oltre a valutare gli effetti a livello riproduttivo, recentemente è stato dimostrato che questi inquinanti sono in grado di interagire anche con il metabolismo lipidico, inducendo la comparsa di steatosi epatica.

### **L'uso del minipig in tossicologia: un modello di non-roditore di rilevanza riconosciuta**

**Cristina Longobardi, Silvana Venturella**  
RTC Research Toxicology Centre Pomezia, Roma

Dall'era dell'addomesticamento della specie, i maiali sono stati ampiamente utilizzati in agricoltura e anche tenuti come animali da compagnia. Nel secolo scorso questa specie si è andata affermando come interessante modello nella ricerca biomedica, soprattutto per studi di fisiologia e chirurgia.

Negli ultimi 20 anni, in seguito all'importante lavoro di miniaturizzazione e standardizzazione di Ellegaard, i minipigs si sono affermati anche in tossicologia, anche grazie ad alcune caratteristiche fisiologiche che rendono il maiale un modello rilevante per la ricerca

traslazionale. In alcuni casi, i motivi per selezionare i minipig come modello sperimentale sono legati ad alcuni effetti di classe che non consentono di usare il cane a causa di una nota ipersensibilità di quest'ultimo o di una sua rilevanza limitata per l'uomo, come accade per alcuni anti-infiammatori o per i simpaticomimetici.

Oltre alle ragioni scientifiche legate alle molte similitudini fisiologiche e anatomiche con gli esseri umani, anche considerazioni di natura etica hanno incoraggiato l'introduzione del minipig nella tossicologia al posto di specie impiegate tradizionalmente quali cane e scimmia. Dal punto di vista anatomico e fisiologico, molte somiglianze con l'uomo sono presenti:

\* nell'apparato tegumentario (portando questa specie ad essere il migliore modello per studi con applicazioni dermali),

\* nel sistema cardiovascolare (e ciò ha favorito l'uso del minipig per le valutazioni cardiovascolari in studi tossicologici e farmacologici),

\* nell'apparato gastroenterico (in quanto il maiale è un vero onnivoro, come l'uomo, a differenza del cane o della scimmia)

\* nell'attività di biotrasformazione epatica (aspetto questo assai importante per la selezione della specie non-roditore per lo sviluppo preclinico dei farmaci).

La prolificità dei minipig, il veloce sviluppo post-natale e la facilità di gestione delle cucciolate, rende inoltre il minipig un modello valido anche per gli studi per farmaci pediatrici (studi di tossicologia *juvenile*).

Per tutti i motivi sopracitati, in questi ultimi anni, si è andato affermando l'uso del minipig per studi di tossicità ripetuta

e pediatrica. In conclusione, consapevoli della validità del minipig come modello sperimentale per lo sviluppo di prodotti farmaceutici e dispositivi medici, RTC da circa 20 anni ha promosso questo modello e ora registriamo un notevole aumento di interesse da parte dell'industria e accettazione da parte delle autorità regolatorie per studi di tossicologia.

Nel minipig è possibile applicare tutte le vie di somministrazione da quelle convenzionali a quelle meno standard e, con un adeguato addestramento, è possibile ridurre lo stress e ottenere risultati affidabili. La gestione dei minipig è semplice ma richiede una buona tecnica, pazienza ed esperienza.

Nel corso della presentazione verranno illustrate alcune tecniche di trattamento di questa specie applicate nel corso di studi di tossicologia.

## **Spera le ragioni della ricerca: la ricerca va a scuola**

**Annarita Wirz**

*Federazione SPERA - Le Ragioni della Ricerca*

Cos'è la ricerca? Quale è il suo scopo? Cosa fanno gli scienziati nei laboratori? La scienza è così lontana dalla nostra vita quotidiana?

Rispondere a queste domande è il primo passo per dare nuovo slancio alla ricerca scientifica in Italia. Una divulgazione scientifica corretta e comprensibile fatta da professionisti è fondamentale per fornire ai cittadini uno strumento per sviluppare una capacità critica necessaria ad elaborare un'opinione personale su vari aspetti della ricerca al di là dei pregiudizi. Tutto ciò è estremamente importante perché i cittadini, sebbene possano sentirsi lontani e persino

estranei al mondo della scienza, sono in realtà i destinatari finali di tutte le ricerche. Ecco perché il 5 dicembre 2016 è stata creata la Federazione "SPERA - Le ragioni della ricerca" che riunisce diverse associazioni scientifiche. Il nostro principale strumento è il contatto diretto con le nuove generazioni - portando l'esperienza degli scienziati nelle scuole per scoraggiare gli studenti dal valutare i risultati scientifici in base solo a quanto affermato dalla televisione, dai social media o da persone non adeguatamente preparate. I ricercatori sono andati nelle scuole elementari, medie e superiori per parlare di argomenti che vanno dalla zoologia alle neuroscienze, affrontando temi delicati come l'uso del modello animale nella ricerca biomedica, i vaccini e le dipendenze da sostanze d'abuso e non solo. Secondo l'età degli studenti, sono stati adottati diversi approcci per presentare questi argomenti: giochi, dibattiti e discussioni aperte sono stati estremamente interessanti e promettenti. È stato anche importante coinvolgere studenti universitari e dottorandi. Le attività di SPERA nelle scuole proseguiranno per l'anno scolastico in corso, sperando che sempre più ricercatori vogliano essere coinvolti per spiegare il loro lavoro quotidiano.

**Abbiamo ancora bisogno della sperimentazione animale?  
Riesame della direttiva 2010/63/  
UE sulla protezione degli animali  
utilizzati a fini scientifici**

**Giuliano Grignaschi**

*IRCCS-Istituto di Ricerche Farmacologiche  
Mario Negri, Milano*

Nel 2010 l'Unione Europea (UE) ha

adottato una nuova Direttiva (2010/63/UE) sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, sostituendo la precedente datata 1986. Al momento dell'emanazione della Direttiva, il legislatore ha ritenuto opportuno prevedere un riesame dei risultati ottenuti grazie alla sua implementazione ed ha quindi individuato nel 10 novembre 2017 il limite temporale per la sua effettuazione da parte della Commissione Europea (Art. 58). La procedura per il riesame ha previsto il coinvolgimento di tutti i portatori di interesse: centri di ricerca pubblici e privati, autorità competenti, industrie, associazioni di protezione degli animali, pazienti, centri di ricerca sulle 3R, veterinari etc. e si è avvalsa della somministrazione di questionari seguita da un incontro aperto per la discussione dei risultati (31 marzo 2017, Bruxelles). Tutte le 28 nazioni facenti parte della UE hanno risposto, anche se con percentuali diverse, ad indicare un buon livello di efficacia dell'iniziativa. I risultati del riesame, pubblicati l'8 novembre del 2017, hanno però risentito del grave ritardo nella trasposizione della Direttiva da parte di molti paesi (tra cui l'Italia che l'ha recepita solo nel marzo del 2014); questo ha fatto sì che fosse troppo presto per poter valutare appieno l'efficacia della Direttiva nell'implementazione delle 3R sul territorio Europeo. Tuttavia almeno due cose sono state rilevate chiaramente: la Direttiva è stata considerata da tutti i partecipanti al riesame necessaria e rilevante per il conseguimento degli obiettivi sul benessere animale e, tenuto conto della relazione del Comitato Scientifico dei Rischi Sanitari Ambientali ed Emergenti (CSRSAE), si ritiene ancora necessario l'utilizzo dei primati

non umani. Particolare attenzione inoltre è stata dedicata ai cefalopodi per i quali si è evidenziata la necessità di inserire, non appena saranno scientificamente disponibili, maggiori dettagli sulla loro cura e sistemazione e opportuni metodi di soppressione (Allegati III° e IV°).

### **Test innovativi per la valutazione della sicurezza *in vitro* e microbiologica dei prodotti cosmetici** (Giorno 11 aprile 2018, 17.00-17.30)

#### **Un nuovo approccio per la valutazione della sicurezza dei prodotti cosmetici mediante combinazione di metodi *in vitro* e *in vivo***

**R. Vicini<sup>1</sup>, A. Buzzella<sup>1,2</sup>, G. Mazzini<sup>3</sup>,  
C. Angelinetta<sup>1</sup>, E. Regola<sup>1</sup>, F. Bianchi<sup>1</sup>,  
O. Pastoris<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bio Basic Europe S.r.l., Milano, <sup>2</sup>Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia, <sup>3</sup>Istituto di Genetica Molecolare, CNR, Pavia

Il regolamento Europeo 1223/2009 vieta l'immissione sul mercato di prodotti cosmetici la cui formulazione finale o i cui ingredienti siano stati oggetto di sperimentazione animale e nel contempo impone che tali prodotti siano sicuri per la salute umana. Da qui la necessità di impiegare metodi alternativi alla sperimentazione animale che siano convalidati e ufficialmente approvati a livello comunitario. Molti di questi metodi si basano su tecniche *in vitro* su colture cellulari, che hanno il vantaggio di essere sistemi di facile gestione, economici e rapidi, ma di contro forniscono

dei modelli previsionali non sempre direttamente traslabili al sistema *in vivo*. Per questo motivo è particolarmente utile ricorrere ad una strategia combinata di test *in vitro* e *in vivo* in grado di fornire un maggior numero di informazioni utili a garantire la sicurezza per l'utilizzatore finale dei prodotti cosmetici testati. In questo contesto abbiamo messo a punto un test multi-step per valutare l'elevata tollerabilità dei prodotti cosmetici che prevede l'esecuzione sequenziale di test *in vitro* e *in vivo*.

Sono stati testati **193** prodotti cosmetici di diversa natura. Il primo step prevede l'esecuzione di un test pro-sensibilizzante *in vitro* su colture di monociti umani, che si basa sulla valutazione mediante citofluorimetria di flusso della variazione della morfologia cellulare e dell'espressione di CD86 e CD54 indotta da sostanze sensibilizzanti. Le cellule sono state mantenute in coltura per 48 ore prima di essere trattate per 24 ore con i prodotti testati alla più alta concentrazione non citotossica, determinata in base ai risultati di un test preliminare di vitalità cellulare. Cellule mantenute in terreno di coltura rappresentano il controllo negativo; come controllo positivo si è utilizzato NiSO<sub>4</sub>. Dopo immunomarcatura con anticorpi monoclonali anti-CD86 e anti-CD54 marcati FITC i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro.

Verificata l'assenza di potenziale pro-sensibilizzante *in vitro*, i prodotti sono stati sottoposti al secondo step di analisi clinica *in vivo* su volontari. Per valutare il potenziale potere irritante e sensibilizzante è stato eseguito un patch test su 25 volontari: 20 µl/cm<sup>2</sup> di prodotto (o 20 µg/cm<sup>2</sup> per i solidi)

sono stati applicati sulla schiena dei volontari. Dopo 24 ore il prodotto è stato rimosso e si è valutata la comparsa di reazioni cutanee (eritema ed edema) nell'arco delle 24 ore successive, attribuendo un punteggio da 0 (assenza di eritema/edema) a 4 (eritema/edema grave). Il test è stato eseguito a livello ambulatoriale sotto supervisione di un medico dermatologo.

Confermata l'assenza di potenziale irritante e sensibilizzante *in vivo* i prodotti oggetto dello studio sono stati sottoposti ad indagine clinica per verificare la tollerabilità cutanea a lungo termine: 20 volontari hanno utilizzato i prodotti quotidianamente per 28 giorni consecutivi durante i quali è stata registrata l'insorgenza di eventuali lievi effetti indesiderati (secchezza, arrossamento, bruciore, prurito).

182 prodotti su 193 (94.3%) non hanno mostrato attività pro-sensibilizzante *in vitro*. Questi prodotti hanno dato esito negativo anche al patch test (assenza di eritema/edema) e al test di tollerabilità cutanea (assenza di effetti indesiderati). 11 prodotti (5.7%) hanno invece mostrato un effetto pro-sensibilizzante *in vitro*, ma sono stati comunque sottoposti ad analisi clinica *in vivo* per verificarne la tollerabilità cutanea. Tutti i prodotti hanno dato esito negativo al patch test (assenza di eritema/edema) e al test di tollerabilità cutanea (assenza di effetti indesiderati).

Possiamo concludere che i test su colture cellulari *in vitro* consentono di prevedere con buona approssimazione la sicurezza d'uso *in vivo* dei prodotti cosmetici. Tuttavia la presenza *in vitro* di un'azione indesiderata sembrerebbe non comportare la comparsa di tale azione

anche *in vivo*. In questi casi è quindi opportuno approfondire l'analisi con specifici test *in vivo*.

### **Sviluppo di un metodo alternativo per la valutazione *in vitro* del potenziale sensibilizzante**

**A. Buzzella<sup>1,2</sup>, R. Vicini<sup>2</sup>, G. Mazzini<sup>1,3</sup>, C. Angelinetta<sup>2</sup>, O. Pastoris<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani", Università degli Studi di Pavia, <sup>2</sup>Bio Basic Europe S.r.l., Milano, <sup>3</sup>Istituto di Genetica Molecolare (IGM-CNR), Pavia

La dermatite allergica da contatto (DAC) è una reazione infiammatoria indotta dalla ripetuta esposizione della pelle a determinate sostanze chimiche. Ad oggi rappresenta un problema piuttosto comune per la salute umana, soprattutto all'interno di professioni in cui i lavoratori sono regolarmente esposti a prodotti chimici o nei cosiddetti *wet works* (ad esempio parrucchieri). Tuttavia, anche i cosmetici e i prodotti per la casa possono contenere numerose sostanze ad azione pro-sensibilizzante. Questi, essendo prodotti destinati ai consumatori, devono rispettare precise disposizioni legislative che garantiscono la sicurezza del prodotto stesso e tutelano la salute dei consumatori. In Italia i cosmetici sono disciplinati dal Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento Europeo, entrato in vigore a partire dal luglio 2013, secondo il quale è proibito il testing su animali da laboratorio per cosmetici e relativi ingredienti.

Per soddisfare i requisiti della legislazione europea relativa alla valutazione dei pericoli di potenziali sensibilizzanti cutanei sono stati compiuti notevoli progressi nello sviluppo di metodi di

prova alternativi *in chemico/in vitro*, fra cui lo *human cell line activation test* (h-CLAT). Il test h-CLAT ha come target il terzo degli eventi chiave di un *adverse outcome pathway* (AOP), corrispondente all'attivazione delle cellule dendritiche. Tale metodica richiede l'utilizzo di una linea cellulare di monociti umani (THP-1) e si basa sulla valutazione dell'espressione degli antigeni di membrana CD54 e CD86 mediante analisi citofluorimetrica. Gli antigeni vengono rilevati grazie ad anticorpi monoclonali coniugati con FITC. Basandoci su questo metodo, sono stati analizzati una serie di prodotti chimici con potenziale sensibilizzante noto e non. La fluorescenza emessa, generalmente a bassa intensità, ha generato problemi nell'analisi e nell'interpretazione dei dati ottenuti poiché non è risultata tale da permettere la discriminazione fra sostanze sensibilizzanti e non-sensibilizzanti.

Per questo motivo lo scopo dello studio è stato quello di trovare un parametro citometrico alternativo, più sensibile rispetto alla fluorescenza, al fine di valutare il potenziale sensibilizzante delle diverse sostanze chimiche.

Al telescopio, le cellule sono state analizzate mediante analisi citofluorimetrica, a seguito del trattamento con differenti composti sensibilizzanti e non sensibilizzanti somministrati a concentrazioni non citotossiche. Mentre come analisi di controllo, un set di cellule non è stato esposto ad alcun prodotto chimico.

Le sostanze con potenziale sensibilizzante noto hanno indotto evidenti modifiche morfologiche nelle cellule THP-1, in particolare la morfologia cellulare viene modificata in una più condensata che

permette alle cellule di essere facilmente identificate al microscopio, come sottopopolazione «sensitized». Queste modifiche inducono alterazioni simili nei parametri di «scattering» cellulare rendendo così le cellule facilmente monitorabili con la citometria a flusso. Nessun cambiamento è stato invece osservato nelle cellule trattate con sostanze non sensibilizzanti e nelle cellule di controllo (non trattate).

In conclusione, questo metodo basato sull'analisi dei parametri di *forward scatter* e *side scatter* può essere utilizzato come valido metodo alternativo *in vitro* per l'identificazione del potenziale sensibilizzante di composti chimici.

### **Evoluzione dei nuovi sistemi conservanti e verifica della loro efficacia secondo la normativa UNI EN ISO 11930:2012**

**V. Cattaneo<sup>1</sup>, M. Foppiani<sup>2</sup>, C. Angelinetta<sup>2</sup>, O. Pastoris<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia e Biotecnologie

“L. Spallanzani”, Università degli Studi di Pavia,

<sup>2</sup>Bio Basic Europe S.r.l., Milano

A causa della loro composizione, spesso ricca in acqua, lipidi, polisaccaridi, proteine, peptidi, amminoacidi e vitamine, i cosmetici costituiscono un substrato ideale per lo sviluppo di una grande varietà di microrganismi, con i quali possono venire a contatto in qualunque fase della loro vita di prodotto: dalla produzione al confezionamento, dall'immagazzinamento, alla distribuzione, all'utilizzo da parte del consumatore.

Allo scopo di proteggere la salute del consumatore dal rischio di contrarre patologie connesse all'utilizzo di un cosmetico contaminato, compresi i

rischi tossicologici ed allergologici dovuti alla presenza di eventuali metaboliti microbici, il Regolamento (CE) n. 1223/2009 sui prodotti cosmetici prevede che, nella formulazione di un prodotto cosmetico, siano impiegati dei sistemi conservanti, ovvero delle miscele di selezionate sostanze, esclusivamente o principalmente destinate ad inibire lo sviluppo di micro-organismi. Inoltre, il Regolamento prevede che l'efficacia della protezione antimicrobica conferita al prodotto cosmetico dal suo sistema conservante sia comprovata già durante la fase di progettazione del prodotto, e comunque prima della sua immissione sul mercato, tramite l'esecuzione di opportuni test microbiologici, come ad esempio il *Challenge Test*.

Tutte le sostanze di cui è autorizzato l'impiego nei sistemi conservanti ed i relativi limiti di concentrazione sono elencate nell'Allegato V, tuttavia oggi si assiste sempre più spesso all'immissione sul mercato di prodotti cosmetici contenenti stabilizzanti antimicrobici che non possono essere considerati veri e propri sistemi conservanti, non essendo compresi nel suddetto Allegato V, ma che di fatto ne svolgono la funzione, poiché contribuiscono alla protezione antimicrobica del prodotto.

Il presente lavoro ha quindi riguardato l'esecuzione di *Challenge Test* su prodotti cosmetici contenenti "conservanti non conservanti" con lo scopo di valutarne l'effettiva capacità di conferire una protezione antimicrobica al prodotto cosmetico in cui sono contenuti.

Genericamente, un *Challenge Test* consiste nel tentativo di riprodurre in laboratorio l'aggressione microbica che un cosmetico potrebbe subire durante

tutte le fasi della sua vita di prodotto. Dal punto di vista operativo, ciò consiste nell'inoculo del prodotto che si intende saggiare con ceppi microbici riferibili alle principali tipologie batteriche e micetiche che possono contaminare i cosmetici. Successivamente, ad intervalli di tempo prestabiliti, si prelevano aliquote del prodotto cosmetico artificialmente contaminato per verificare la vitalità dei microrganismi in esso inoculati tramite conta in piastra delle UFC/g o ml. L'efficacia del sistema conservante viene considerata adeguata quando si verifica una riduzione dell'inoculo compatibile con i parametri previsti dalla specifica metodica in uso. Infatti, nonostante il Regolamento (CE) n.1223/2009 indichi il *Challenge Test* tra saggi eseguibili per valutare la stabilità microbiologica di un prodotto cosmetico, ad oggi non esistono metodi ufficiali per l'esecuzione del test, ma solo metodi normati o pubblicati nelle linee guida delle associazioni di categoria. Tra questi, il più comunemente utilizzato, e al quale si è dunque deciso di fare riferimento nell'esecuzione del presente lavoro, è il metodo UNI EN ISO 11930:2012, originariamente sviluppato per la valutazione della protezione antimicrobica dei sistemi conservanti autorizzati, di cui è fatta menzione nell'Allegato. I "conservanti non conservanti" sono dunque stati analizzati come sistemi conservanti veri e propri ed i risultati così ottenuti hanno mostrato che queste sostanze sono effettivamente in grado di conferire un'adeguata protezione antimicrobica ai prodotti cosmetici in cui sono contenuti. Tuttavia, alcuni risultati ai limiti dei requisiti imposti dalla norma pongono una riflessione circa l'eventuale necessità di valutarne il

comportamento in condizioni più severe, al fine di poter fornire una garanzia circa la stabilità microbiologica del prodotto al consumatore.

## **Modelli cinetici in tossicologia**

**(Giorno 12 aprile, 9.00-10.30)**

### **Impiego dei test di fenotipizzazione dei citocromi epatici *in vivo* per predire il rischio di reazioni avverse nell'uomo**

**Roberto Padrini**

*Dipartimento di Medicina, Università di Padova*

Le reazioni avverse ai farmaci sono spesso dovute ad una ridotta capacità dell'organismo di eliminare i farmaci attraverso gli organi emuntori principali - rene e fegato. Mentre la funzionalità renale può essere facilmente misurata attraverso la *clearance* della creatinina, la capacità metabolica del fegato non dispone di test routinari che possano quantificare l'attività dei singoli enzimi implicati nel metabolismo dei farmaci. In campo sperimentale, tuttavia, sono state messe a punto varie metodiche di fenotipizzazione dei citocromi epatici che permettono di misurare *in vivo* l'attività di singoli enzimi o gruppi di enzimi in maniera minimamente invasiva. Tali tecniche prevedono la somministrazione di piccole dosi di farmaci "sonda" metabolizzati da un singolo citocromo e la misurazione di parametri farmacocinetici plasmatici e/o urinari correlati con l'attività dell'enzima (*clearance* plasmatica, rapporto metabolico, etc.).

Sono stati validati numerosi "cocktail" di farmaci sonda che consentono di valutare contemporaneamente l'attività dei citocromi maggiormente implicati nel metabolismo dei farmaci. Rispetto ai più noti test di genotipizzazione dei citocromi caratterizzati da polimorfismo genetico (CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, etc.), la fenotipizzazione consente una migliore previsione dell'attività enzimatica nelle situazioni cliniche in cui può esistere una discordanza tra genotipo e fenotipo per il sovrapporsi di meccanismi post-trascrizionali, post-traduzionali ed epigenetici che modificano l'espressione genica. Cause note di discordanza sono la presenza di patologie epatiche, renali, infiammatorie, neoplastiche, l'uso di farmaci inibitori enzimatici che possono trasformare genotipi "metabolizzatori rapidi" in fenotipi "metabolizzatori lenti". Allo stesso modo i "metabolizzatori rapidi" possono diventare "ultrarapidi" per effetto dell'induzione enzimatica (da farmaci, da gravidanza). Clinicamente l'impiego della fenotipizzazione enzimatica ha dimostrato la possibilità di prevedere la tossicità di alcuni farmaci antitumorali (irinotecan, vincristina, azatioprina), la loro *clearance* (erlotinib, sunitinib, gefitinib, vinorelbina) o le loro concentrazioni plasmatiche (endoxifene). Inoltre, la fenotipizzazione consente di studiare le possibili interazioni farmaco-metaboliche (induzione/inibizione) in una fase precoce dello sviluppo dei nuovi farmaci o di comprendere il meccanismo alla base di reazioni avverse o dell'inefficacia di farmaci già in uso terapeutico. Nel corso della relazione verranno presentati esempi di tali applicazioni e i loro limiti.

**La sfida del “Think-Exposure-First!”: metodi predittivi applicati alla valutazione del prodotto Agrochimico**

**Marco Corvaro**

*Human Health Assessment, Dow Agrosiences, Rome*

La valutazione del rischio prevista delle vigenti normative agrochimiche è guidata da “dosi esterne” somministrate a 4 specie animali richieste dalle normative (test clinici sull'uomo non sono attualmente possibili). Nonostante non sia strettamente necessario per la registrazione, la valutazione traslazionale dell'esposizione interna accanto alla caratterizzazione tossicodinamica è di chiara utilità ed è stata supportata da numerose pubblicazioni e regolamenti. Verranno presentati esempi tradizionali di programmi animali per la caratterizzazione della sensibilità delle specie/rilevanza per la salute umana e la selezione delle dosi, utilizzando più dosi massime di derivazione cinetica (non-MTD).

Molti modelli predittivi per ADME sono stati sviluppati per decenni nei settori del farmaceutico e ancor più di recente nel cosmetico. Questi strumenti offrono un'opportunità unica per caratterizzare l'esposizione interna e le differenze tossicocinetiche tra le specie. Verrà discussa l'utilità di questi strumenti per la caratterizzazione della rilevanza umana dei risultati della tossicologia e dei fattori che influenzano l'accettazione a livello regolatorio e normativo.

Le applicazioni attuali e future includono l'uso per progettare una “chimica verde” più sostenibile nel processo agrochimico di R & S e il potenziale per uno spostamento verso la valutazione

della sicurezza (interna) basata sull'esposizione, già in atto in altri settori delle industrie regolamentate.

**Sfide nella valutazione del rischio da prodotti fitosanitari**

**(Giorno 12 aprile, 9.00-11.00)**

**La durata dell'esposizione: informazione negletta nella valutazione del rischio da pesticidi**

**C. Colosio, F. M. Rubino**

*University of Milan, Department of Health Sciences and International Centre for Rural Health, Saints Paolo and Carlo Hospital, Milano*

**Introduzione**

In ambito di valutazione preliminare all'autorizzazione all'impiego, ma anche in studi sul campo, la valutazione del rischio da antiparassitari è condotta ipotizzando che la durata di una giornata lavorativa sia pari a 8 ore. Purtroppo, in agricoltura, la giornata lavorativa non ha praticamente mai una durata standard, e nella raccolta di dati condotta in corso di studi sul campo, con stima dell'assorbimento cutaneo, non si tiene conto del fatto che i lavoratori lavano le mani più volte durante la giornata lavorativa. In questi casi, considerare la durata di esposizione del corpo e delle mani 8 ore senza considerare eventuali lavaggi effettuati nel corso della giornata potrebbe portare un errore nella valutazione della dose assorbita e, quindi, del rischio per la salute.

**Obiettivi**

Lo scopo di questo studio era di stimare la dose di antiparassitario assorbita

in corso di applicazioni in agricoltura e quantificare l'influenza della durata dell'esposizione sulla dose interna usando una nuova tecnica statistica.

### **Metodi**

In una serie di studi sul campo su 29 lavoratori che avevano applicato il fungicida etilenbisditiocarbammato di manganese e zinco (mancozeb) su vigneti per 38 giorni lavorativi, sono stati raccolti tre set di dati: informazioni dettagliate sulle attività lavorative svolte per ogni giornata lavorativa, dose cutanea "potenziale" (al di sopra dell'abbigliamento) e effettiva (sulla cute) attraverso l'applicazione di pads cutanei. È stata inoltre determinata la concentrazione del principale metabolita del mancozeb, etilentiourea (ETU), sia nelle 24 ore precedenti l'esposizione sia nelle 24 successive. La valutazione statistica è stata condotta utilizzando il linguaggio e l'ambiente per il calcolo statistico "R".

### **Risultati**

L'aver considerato nei nostri calcoli la durata dell'esposizione ha portato a una riduzione significativa e quindi a stime più realistiche della dose assorbita rispetto alle stime condotte ipotizzando una giornata lavorativa standard. In particolare, la dose totale assorbita (escluse le mani), la dose assorbita attraverso le mani, e la dose totale sono risultate pari a meno di 1 ng/kg pc, 3 ng/kg pc e 3 ng/kg pc rispettivamente considerando un turno di 8 ore. La correzione per tempo reale del turno e lavaggio delle mani ha portato ad una riduzione, rispettivamente, del 50%, 81% e 80%. Dopo tale elaborazione, la dose totale assorbita correlava meglio con i livelli di ETU delle urine delle 24 ore post-

esposizione rispetto alla dose delle mani, sebbene più del 90% della dose totale assorbita stimata provenga dalle mani.

### **Conclusioni**

Una migliore capacità di stimare la dose totale di antiparassitari assorbita, unitamente all'identificazione di indicatori biologici di dose affidati e validati, come nel nostro caso l'ETU urinaria, possono facilitare la modellizzazione dei livelli di esposizione e permettere di mettere a punto strumenti per la valutazione del rischio senza necessità di ricorrere a misure ("profili"), o anche promuovere l'uso del monitoraggio biologico nella valutazione del rischio da antiparassitari in un ambito critico come l'agricoltura.

### **Uso dei dati epidemiologici nella definizione del rischio**

**E. Negri<sup>1</sup>, C. La Vecchia<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche,

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano, Milano

Per la valutazione del pericolo (*hazard*), esistono degli schemi consolidati per integrare le evidenze epidemiologiche e tossicologiche. Recentemente, è stata manifestata da più parti, incluse le agenzie regolatorie, la necessità di incorporare le risultanze epidemiologiche nel processo di valutazione del rischio. Vi sono chiari vantaggi nell'utilizzare gli studi sull'uomo, rispetto a quelli sugli animali, che includono la possibilità di identificare alcuni effetti avversi specifici (es. nausea, cefalea), la possibilità di derivare se e a che dose si verificano effetti avversi evitando estrapolazioni e considerazioni sul benessere animale. Uno schema proposto da ECETOC[1] per la valutazione del rischio propone

di valutare la qualità delle evidenze epidemiologiche e animali, e utilizzare quelle sull'uomo quando queste siano di qualità accettabile. In caso la qualità non sia ottimale, viene suggerito di considerare gli studi più positivi/ applicare i limiti più bassi che derivano dalle due evidenze. Una riflessione interessante di questo schema riguarda il fatto che la qualità dell'evidenza epidemiologica non dipende solamente dalla natura intrinseca del tipo di studio epidemiologico, ma anche dal tipo di evento avverso. Per esempio, anche in assenza di studi epidemiologici sofisticati, le evidenze umane possono essere giudicate di alta qualità in caso di eventi avversi acuti e/o specifici per la sostanza (es. cloruro di vinile monomero e angiosarcoma del fegato).

Sono stati sviluppati alcuni schemi per combinare le evidenze epidemiologiche allo scopo di determinare la causalità di una relazione esposizione-effetto. Lo schema Epid-Tox[2], in particolare, prevede 5 passaggi: 1) raccolta sistematica della letteratura scientifica; 2) classificazione di ogni studio in accettabile/supplementare/inaccettabile in base alla qualità; 3) valutazione "weight of evidence" sia epi che tox; 4) assegnazione di una conclusione scalabile in termini di plausibilità biologica (tox) e evidenza di effetto sull'uomo (epi); 5) collocazione di queste su una griglia di causalità relazionale il cui schema grafico viene fornito nell'articolo. Alcuni "case studies" condotti dal nostro gruppo stanno evidenziando i vantaggi e le debolezze di questo schema in varie situazioni.

Un aspetto che ricorre in questi schemi è la valutazione della qualità dei dati

epidemiologici. Generalmente, per molte sostanze, sono disponibili al più studi di epidemiologia osservazionale. Non potendo ricorrere alla randomizzazione per l'assegnazione dell'esposizione, un elemento cruciale è che potenziali fattori di confondimento siano stati misurati e controllati nell'analisi, e si possa giungere alla conclusione che il loro effetto non influenzi l'interpretazione dello studio.

Nel campo degli studi clinici (randomizzati) molto lavoro è stato svolto per giungere a conclusioni sull'efficacia degli interventi medici basate sulle evidenze. Un concetto sviluppato in quell'ambito è quello di "risk of bias". Più che la qualità assoluta di uno studio, quello che in realtà interessa è valutare quanto affidabili siano le conclusioni, quanto cioè il rischio di distorsioni legate a errori sistematici possa inficiarne i risultati. In alcuni schemi di valutazione della qualità infatti compaiono aspetti che non sono necessariamente legati a distorsioni (es calcolo a priori del potere dello studio). Molti strumenti non sono stati sviluppati con lo specifico obiettivo di essere utilizzati in uno schema di valutazione del rischio e nessuno è stato validato massivamente.

Inoltre, gli studi epidemiologici non sono generalmente disegnati per la valutazione del rischio di una specifica sostanza e la misura dell'esposizione non è sufficientemente specifica per permettere di fare inferenze, possibilmente quantitative, sulla sostanza in esame.

1. <http://www.ecetoc.org/uploads/Publications/documents/TR%20104.pdf>
2. Adami *et al.* *Toxicol Sci* 2011;22:23-34

## Neurotossicità dello sviluppo

**Andrea Terron**

*European Food Safety Authority, Parma*

Although starting as a small tube of ectoderm, embryonic development is a very complex biological process and human brain must undergo a series of time correct sequence of stages. Each of these physiological processes is vulnerable to adverse effects from exposures to toxic environmental chemicals. Humans are indeed more susceptible to developmental neurotoxicity (DNT) and some of the human brain functions are difficult to explore and quantify in animal experimentation i.e. cognitive function, skills, behaviour. The use of animal experiments has limitations given the recognised molecular and species differences with the additional intrinsic difficulty in interpreting such a complex studies with so many endpoints measured (OECD TG 426). Moreover, DNT testing is dependent on triggers from systemic toxicity testing in adult rodents, which may not be sensitive enough as some processes are specific for brain development only and are not present in the adult brain. Indeed, only few environmental substances have been actually tested for DNT. The consequence is a knowledge gap in chemical testing as well as in the mechanistic understanding for DNT. Over the last decade a number of scientific initiatives have concluded that development of in vitro assays and other alternative methods could provide the basis for non-in vivo based testing strategy and support a mechanistic shift using a human relevant test system

like the human pluripotent stem cells. It is now important to understand what the scientific premises are and how to move from the academic perspective to the regulatory switch from a risk assessment based on identification of apical endpoints to a more mechanism-based risk assessment. From a strategic view, it is now necessary to come to a conclusive consensus on defining alternative methods to be assembled in a DNT testing battery able to explore the key cellular processes critical to normal brain development and define the next steps for regulatory use. Although uncertainties still exist precluding a straightforward replacement from in vitro to in vivo, recent data indicate that in vitro efficient models are available and should now considered for regulatory application. As a scientific consensus already exists, what we need now is to move on with testing to fill the gaps on methods performance, and regulatory acceptance of the methods. The ultimate aim is to build a predictive, valid and flexible model, able to respond to different regulatory-based problem formulations.

## Nano Fitofarmaci: un problema emergente

**I. Iavicoli, V. Leso**

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

La nanotecnologia, scienza applicata alla realizzazione di materiali, dispositivi e sistemi di dimensioni nanometriche, offre interessanti soluzioni in una serie di settori produttivi, tra cui quello agricolo (Iavicoli e coll. 2017). In

quest'ambito, tale tecnologia è stata applicata alla produzione di nano-fitofarmaci, un eterogeneo gruppo di sostanze ad azione insetticida, fungicida, erbicida, e fito-regolatoria. I benefici di tale applicazione riguardano prevalentemente l'incremento della produzione agricola, la protezione delle piante da stress di natura biotica e abiotica, la riduzione dell'impiego di agro-farmaci convenzionali. Questi aspetti favoriscono la diffusione di tecniche agronomiche finalizzate alla prevenzione delle fitopatie, all'impiego di prodotti fitosanitari innovativi e a basso impatto ambientale allo scopo di sviluppare un'agricoltura sostenibile.

In questa prospettiva, i "nano-fertilizzanti" sono in grado di fornire macro o micro-nutrienti essenziali alla produzione vegetale in forma nanometrica; possono migliorare le prestazioni dei fertilizzanti convenzionali; aumentare l'efficacia fotosintetica e l'attività enzimatica delle piante, come nel caso dei nanotubi di carbonio o di nanoparticelle di biossido di titanio, senza fornire nutrienti in maniera diretta (Liu e Lal, 2015). I vantaggi di tali applicazioni sono il rilascio controllato dei fertilizzanti o dei nutrienti, il loro più efficiente trasporto e assorbimento a livello dei siti bersaglio, una migliore biodisponibilità, ed una riduzione degli effetti tossici delle sostanze chimiche convenzionali in particolare in relazione alla ridotta immissione nelle matrici ambientali e alla diminuzione del processo di eutrofizzazione. Nano-fitofarmaci ad azione antiparassitaria ed erbicida, possono includere principi attivi in dimensione nanometrica, nanomateriali

inorganici con proprietà antiparassitarie, come nel caso di nanoparticelle d'Argento, ma anche nano-strutture, ad es. nano-emulsioni e nano-capsule, in grado di veicolare e rilasciare, in maniera controllata e mirata, i principi attivi, aumentandone la stabilità, il trasporto, la biodisponibilità, l'efficacia ed evitandone il sovradosaggio.

Tuttavia, le conoscenze scientifiche in merito alla reattività biologica di tali nano-fitofarmaci una volta dispersi nell'ambiente, sia in termini di fito-tossicità che di eco-tossicità, come anche di trasferimento nella catena alimentare, e di rischio per la salute pubblica, sono piuttosto limitate (lavicoli e coll. 2014). Attenzione crescente della comunità scientifica è stata inoltre posta sui possibili rischi per la salute e la sicurezza dei lavoratori esposti a tali nanomateriali in fase di sintesi e progettazione, di produzione, trasporto e applicazione delle nano-formulazioni, come anche sui possibili rischi derivanti dall'esposizione ambientale residua per gli agricoltori non direttamente coinvolti nella manipolazione dei nano-fitofarmaci.

L'aspetto occupazionale è ulteriormente complicato dalla difficoltà di valutare un rischio derivante da possibili esposizioni in ambienti aperti, dalla complessità di definire la reattività biologica di nanomateriali le cui proprietà fisico-chimiche primarie possono essere influenzate dall'interazione con le matrici ambientali, dalle limitate conoscenze relative alla tossico-cinetica/dinamica dei nanomateriali una volta assorbiti dall'organismo e dalle differenti modalità/tempi di esposizione legati

alle caratteristiche intrinseche delle attività lavorative. Pertanto, ulteriori studi appaiono necessari per definire il comportamento tossicologico di tali sostanze allo scopo di valutarne adeguatamente i rischi e programmare appropriate misure di prevenzione e protezione per i lavoratori coinvolti.

### **Uso di matrici non convenzionali per il monitoraggio biologico dell'esposizione a pesticidi**

**Silvia Fustinoni**

*Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità,  
Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico  
e Università degli Studi di Milano*

Il monitoraggio biologico dell'esposizione è una tecnica che consente la valutazione della dose assorbita di una sostanza tossica, tenendo in considerazione tutte le possibili vie di esposizione (inalatoria, dermica, orale) e tutte le sorgenti (es: lavorativa, dietetica).

Tradizionalmente il monitoraggio biologico viene effettuato utilizzando un campione di urina o di sangue, più raramente di aria esalata; questo campione viene raccolto in un momento opportuno, identificato in base alle caratteristiche tossico-cinetiche della sostanza oggetto del monitoraggio. Nel caso del monitoraggio biologico dell'esposizione a pesticidi in agricoltura, la pianificazione della raccolta del campione può essere molto critica perché la durata dell'esposizione è variabile e i trattamenti con pesticidi avvengono con protocolli stabiliti in funzione delle condizioni metereologiche e dello stato di salute delle culture. Inoltre i campioni biologici convenzionali

rispecchiano solo esposizioni recenti. Per superare alcuni dei limiti imposti dalle matrici tradizionali, negli ultimi decenni sono stati intrapresi alcuni studi per valutare matrici non convenzionali quali: capelli, latte materno, meconio e saliva.

La caratteristica principale di queste matrici è legata alla possibilità di misurare esposizioni che si riferiscono a periodi di tempo più lunghi e/o che rappresentano esposizioni cumulative e multiple e/o che sono meno invasivi rispetto ai campioni di sangue.

In particolare il latte materno e il meconio sono stati studiati in relazione all'esposizione intra-uterina e dei primi mesi di vita del neonato. Il latte materno è stato anche associato con l'esposizione pregressa delle madri, che hanno accumulato sostanze nel tessuto adiposo.

Il capello è associato ad esposizioni di alcuni mesi precedenti la raccolta del campione; questo perché il capello accumula le sostanze esogene nelle cellule che vengono alimentate da capillari sanguigni durante la loro formazione nel bulbo; queste cellule mantengono poi la memoria dell'esposizione man mano il capello cresce e fungono quindi da sito di accumulo.

La saliva è una matrice non invasiva che può rappresentare un'alternativa al campione di sangue e che può essere raccolta in modo autonomo dai soggetti.

In questo lavoro verranno revisionati i principali studi di monitoraggio biologico dell'esposizione a pesticidi in agricoltura utilizzando matrici non-convenzionali; verranno inoltre

riassunti i principali risultati e i vantaggi e svantaggi associati con l'uso di queste matrici.

## **Approcci metodologici multidisciplinari per la valutazione della sicurezza dei prodotti fitosanitari**

**(Giorno 12 aprile, 11.00-12.00)**

### **Approcci specifici e multidisciplinari per la valutazione della sicurezza di prodotti fitosanitari nelle colture risicole Europee: conclusioni da un workshop ad hoc**

**<sup>1</sup>M. Corvaro, <sup>2</sup>G. Azimonti, <sup>3</sup>R. Cabella, <sup>4</sup>G. Meregalli, <sup>5</sup>M. Rubbiani**

<sup>1</sup>Human Health Assessment, Dow Agrosciences, Rome, <sup>2</sup>Environmental fate and behaviour, ICPS, Milan, <sup>3</sup>Assessor human health risk, INAIL, Rome, <sup>4</sup>Ecotoxicology, Dow Agrosciences, Milan, <sup>5</sup>Center for Chemicals, Cosmetics and Consumer Protection, ISS, Rome

Lo scopo della sessione è quello di evidenziare il valore e le nuove sfide in vari ambiti della tossicologia regolatoria (umana, ambientale, ecotossicologica), connettendo la scienza della valutazione del rischio con la vita reale del territorio italiano, con pratiche agricole più moderne e sostenibili e con la sicurezza alimentare del prodotto alimentare. L'esempio pratico utilizzato per portare il tutto più vicino alla realtà è quello della coltura del riso, economicamente importante e rilevante per il nostro territorio.

Il riso è una coltura maggiore in sud Europa e l'incremento delle resistenze porta ad una maggiore richiesta di

innovazione nei prodotti fitosanitari specifici e necessari per mantenere rese accettabili per questa coltura. Nel contesto del regolamento (EC) 1107/2009 per l'autorizzazione e l'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari, l'applicazione al riso può creare varie difficoltà nella valutazione essendo questa una coltura anomala. Per le agenzie regolatorie si evidenzia una necessità di comprensione delle uniche pratiche agronomiche, tecniche di applicazione e gestione delle acque e dell'impatto ambientale in risaia, da un punto di vista della tossicologia, fatto ambientale ed ecotossicologia regolatorie. Questo gap di conoscenza può creare problematiche nella fase di valutazione e registrazione quando il riso è un uso rappresentativo per l'approvazione di sostanze attive fitosanitarie, dovute alle incertezze per mancanza di conoscenza o trasparenza nel processo regolatorio.

Questi argomenti sono stati trattati con esperti europei di varie discipline provenienti dai maggiori paesi con produzione risicola in un workshop ad hoc tenutosi a luglio 2017. Le principali discussioni ed azioni del meeting verranno presentate. Queste evidenziano la necessità di un approccio multidisciplinare e multisetoriale che copra le associazioni locali, gli istituti di ricerca, le industrie e le agenzie regolatorie al fine di revisionare ed implementare una nuova strategia specifica; idealmente un'agenzia regolatoria dovrebbe guidare il processo per facilitare la discussione nei paesi della "southern zone" definita da legge e l'implementazione successiva a livello europeo.

**La ricerca sui contaminanti ambientali nella tossicologia del XXI secolo: il caso del glifosato****F. Belpoggi, S. Panzacchi, D. Mandrioli, I. Menghetti, F. Gnudi, F. Manservigi***Centro di Ricerca sul Cancro CRCCM Cesare Maltoni, Istituto Ramazzini, Bentivoglio (Bologna)*

Dagli anni del dopoguerra ad oggi il tema del rapporto tra uomo e ambiente è divenuto un nodo fondamentale con cui confrontarsi. Lo sfruttamento incondizionato delle risorse ambientali, l'immissione di sostanze xenobiotiche in natura e l'inquinamento conseguente allo sviluppo delle attività umane hanno determinato pesanti ripercussioni sull'ambiente compromettendo il delicato equilibrio tra ambiente e salute. Oggi l'inquinamento è un fenomeno ubiquitario e capillare, non più limitato esclusivamente agli ambienti lavorativi e alle esposizioni occupazionali. Numerosi agenti fisici, chimici e biologici persistono nell'ambiente, si bioaccumulano negli esseri umani e causano trasformazioni genomiche che interessano l'intera popolazione umana e l'intera eco/biosfera. Il nuovo paradigma della tossicologia del XXI secolo è basato sull'analisi delle esposizioni a basse dosi di contaminanti ambientali in relazione all'insorgenza non solo delle patologie neoplastiche, ma anche di patologie cronico-degenerative in rapido aumento (infertilità, diabete, malattie endocrine, ecc., fino al cancro).

Da circa 40 anni, il Centro di Ricerca si occupa dello studio di sostanze chimiche e agenti fisici diffusi nel nostro ambiente di vita e di lavoro, il più delle volte non adeguatamente studiati per i loro effetti sulla salute. I risultati delle ricerche

del Centro si sono confermati predittivi anche con decenni di anticipo sui rischi per l'uomo e hanno costituito la base per importanti processi regolatori in Europa e nel mondo.

Negli ultimi anni, uno dei filoni di ricerca del Centro sui contaminanti ambientali diffusi si è concentrato sui pesticidi. In particolare, il Glifosato rappresenta uno degli erbicidi più utilizzati a livello mondiale, ed è oggetto ancor oggi di un ampio dibattito scientifico e politico in merito alla potenziale cancerogenicità della sostanza attiva stessa e/o dei formulati commerciali che la contengono (come il Roundup®).

Il Centro ha condotto uno studio "pilota" indipendente, propedeutico allo studio integrato a lungo termine, finalizzato ad ottenere informazioni generali relative alla possibile tossicità del glifosato e del formulato Roundup® in diversi periodi della vita (neonatale, infanzia e adolescenza), e soprattutto ad identificare possibili biomarkers espositivi. Glifosato e Roundup® sono stati testati su ratti Sprague-Dawley entrambi ad una sola dose, corrispondente alla dose giornaliera ammissibile di Glifosato attualmente consentita negli Stati Uniti (Acceptable Daily Intake- ADI USA), pari a 1,75 mg/Kg/bw. I risultati dello studio mostrano come il Glifosato e soprattutto il Roundup®, anche a dosi ritenute sicure (ADI USA) e per un periodo espositivo relativamente breve, possano alterare alcuni parametri biologici di rilievo che riguardano marker correlati allo sviluppo sessuale, alla genotossicità e all'alterazione della microflora intestinale. Il Centro sta pianificando lo studio integrato a lungo termine che verrà condotto nei prossimi 5 anni, nel quale

verrà utilizzato il medesimo modello sperimentale uomo-equivalente, sia per i livelli di dose di Glifosato e Roundup® somministrati, che per la durata dell'esposizione. L'idea è quella di effettuare un unico studio, utilizzando tutti gli animali di una stessa generazione, valutando contemporaneamente i parametri di rilievo relativi alla tossicità sub-cronica, cronica e alla cancerogenesi (OECD TG 453), la tossicità dello sviluppo e riproduttiva ed eventuali effetti neurotossici (OECD TG 443), integrando diverse linee guida OECD. Il vantaggio maggiore è la possibilità di comparare i risultati dei diversi bracci di studio a breve termine con le evidenze a lungo termine. Si potrà infatti verificare se alterazioni dei diversi parametri esaminati nella prima parte della vita corrispondano poi a patologie degenerative, neoplastiche e non, nell'ultimo periodo della vita. Le ricadute pratiche in termini di salute pubblica sono evidenti, poiché con il modello proposto e attraverso tecniche fini come la biologia molecolare, si potranno identificare biomarker espositivi specifici su cui basare azioni di prevenzione primaria e secondaria.

## Si ringrazia **Dompé farmaceutici**

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](http://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. 2 - Settembre 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](mailto:sitox@segr.it)

Sito Web: [www.sitox.org](http://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