

## Cari soci

questo numero di Sitox Informa affronta temi di grandissimo interesse, quale quello spinosissimo della sperimentazione animale. Il recente caso di Green Hill e dell'allevamento di cani beagle ha evidenziato come scienziati e animalisti non abbiano ancora trovato un punto di incontro, nonostante l'avvicinarsi delle scadenze che il nostro Paese dovrà osservare su questo tema e l'esistenza di problematiche ancora aperte e non risolte, soprattutto per quanto riguarda la disponibilità di metodi alternativi. Le Colleghe dell'Istituto Superiore di Sanità ci informano sullo stato dell'arte delle prove a supporto della sicurezza dei prodotti cosmetici, ma, come giustamente sottolinea il titolo, si possono estendere e si estenderanno anche ad altre tipologie di agenti chimici. Marco Pivato ci richiama la legislazione, i numeri e il dibattito tra ricercatori e animalisti. Infine vi diamo un'anteprima su alcuni simposi del prossimo convegno della SITOX, che si terrà a Giardini Naxos il 21-23 marzo. Segue un comunicato stampa della Fondazione Maugeri, che punta il dito su un nemico silenzioso, il monossido di carbonio, e fornisce semplici ma efficienti linee guida di comportamento. Non mi resta altro che augurarvi una buona lettura

**Patrizia Hrelia**

## I metodi alternativi nei test regolatori per cosmetici (e non solo...)

**Laura Turco ed Emanuela Testai**  
(Istituto Superiore di Sanità, Roma)

Trovare approcci alternativi all'uso degli animali nella sperimentazione costituisce un continuo sforzo da parte della comunità europea. Laddove non sia ancora disponibile un metodo completamente in vitro che non sia cioè basato sull'impiego di animali, si persegue comunque lo sviluppo e l'impiego di metodi che prevedano un ridotto numero degli stessi o che quantomeno tengano conto del benessere dell'animale evitandone sofferenza; il principio è quello

cosiddetto delle tre R (*Replacement, Reduction e Refinement*), principio secondo il quale si definisce "metodo alternativo" sia quello che sostituisce in toto l'animale con altri sistemi sperimentali in vitro o in silico (*Replacement*), ma anche quei metodi che prevedono un numero ridotto di animali (*Reduction*) o quelli il cui protocollo di utilizzo sia stato migliorato in termini di benessere animale (*Refinement*). Questi principi etico/scientifici ispiratori di tutta la più recente legislazione in merito di sperimentazione animale sono ancor più stringenti nel campo dei prodotti cosmetici. In questo settore infatti la legislazione (Direttiva 2003/15/CE recepita nel nostro ordinamento con il decreto legislativo n. 50/2005) prevede il bando completo dei test su animali entro il 2013. Attualmente il prodotto finito non viene testato su animali (divieto attuato immediatamente dall'entrata in vigore del Decreto del 2005), mentre per gli ingredienti il divieto è stato imposto con un'attuazione graduale. Per i test di endpoint complessi, infatti, quali tossicità acuta e per dosi ripetute, sensibilizzazione cutanea, carcinogenicità, tossicità riproduttiva e tossicocinetica, era stata prevista come scadenza il 2013, ma dovrà essere

### Indice:

Cari soci - <i>P. Hrelia</i> .....	pag. 1
I metodi alternativi nei test regolatori per cosmetici (e non solo...) <i>L. Turco - E. Testai</i> .....	pag. 1
Entro l'anno via alle nuove regole per la sperimentazione animale - <i>M. Pivato</i> .....	pag. 5
16° CONGRESSO NAZIONALE SITOX	
Valutazione del rischio ambientale nell'ambito della regolamentazione REACH <i>D. Sangalli</i> .....	pag. 8
Sicurezza d'uso e globalizzazione <i>E. Testai</i> .....	pag. 10
Farmaci biosimilari e comparabilità: problematiche emergenti nell'utilizzo dei farmaci biosimilari - <i>C. Pini - A. Meneguz</i> .....	pag. 11
Reazioni avverse ai farmaci <i>M. Lodovici</i> .....	pag. 12
Meccanismi molecolari di Tossicologia. Stress Ossidativi e Cancerogenesi <i>M. Lodovici</i> .....	pag. 13
I metalli nei prodotti cosmetici: dall'inevitabilità tecnologica alla sicurezza d'uso - <i>M. Marinovich</i> .....	pag. 13
Particolato atmosferico: valutazione integrata di rischi e benefici - <i>E. Corsini</i> .....	pag. 13
Prodotti botanici come integratori alimentari: il punto sulla sicurezza - <i>M. Trovato</i> .....	pag. 14
Tavola Rotonda: Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici e la sicurezza dei farmaci - <i>E. Chiesara</i> .....	pag. 14
Intossicazioni da monossido di carbonio: rischi, prevenzioni e cura <i>Comunicato stampa 18/01/2012</i> <i>IRCCS Fondazione S. Maugeri</i> .....	pag. 15

presumibilmente estesa, perché al momento non sono stati identificati metodi alternativi specifici per tali endpoint. La disponibilità o meno di un metodo dipende in primis dal fatto che sia stato sviluppato, ma anche dal superamento del processo cosiddetto di validazione che ne garantisce la validità scientifica in termini di rilevanza e riproducibilità secondo i principi del Centro di Validazione dei Metodi Alternativi (ECVAM); solo un metodo validato può essere utilizzato in ambito regolatorio.

Nel 2010 è stata istituita dalla DG-Sanco una commissione di esperti tossicologi con il compito di valutare lo stato dell'arte per quanto riguarda la disponibilità di metodi alternativi e di individuare le criticità relative agli endpoint tossicologici che per la loro complessità comportano maggiori difficoltà nello sviluppo di metodologie in vitro, nell'ottica di capire quale possibilità ci fosse di rispettare la scadenza del 2013 prevista dalla Direttiva Cosmetici. La commissione si è divisa in gruppi di lavoro focalizzati su specifici endpoint: tossicocinetica, sensibilizzazione cutanea, tossicità per dosi ripetute, carcinogenicità, tossicità riproduttiva. Pur essendo l'attività di ciascun gruppo di lavoro specificamente indirizzato alle esigenze relative alla valutazione dei cosmetici, è ovvio che le conclusioni raggiunte, che sono state pubblicate su *Archives of Toxicology* (Adler et al, 2011), sono altrettanto valide anche per altre classi di sostanze chimiche che debbano essere valutate a scopo regolatorio. Di seguito si riassumono le conclusioni divise per effetto tossicologico.

### Tossicocinetica

Gli studi di tossicocinetica forniscono le informazioni sulla penetrazione e il destino all'interno dell'organismo delle sostanze tossiche. Tali informazioni sono indispensabili in primis per la stima del valore soglia di esposizione al di sotto del quale poter assicurare un rischio sufficientemente basso da poter essere accettato, ma consentono anche la stima di dosi attese a livello di organi e tessuti bersaglio (dose interna) correlate ad effettive dosi di esposizione (dose esterna) relative allo scenario di utilizzo dello specifico tipo di cosmetico.

Questa area tossicologica costituisce un ruolo chiave nello sviluppo di sistemi sperimentali in vitro, poiché ne amplia in modo sostanziale lo spettro di applicabilità dai più semplici studi di effetti locali (individuazione del pericolo) a valutazioni di tossicità sistemica che implicano necessariamente la conoscenza dei vari aspetti

tossicocinetici quali assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME) delle sostanze cui l'uomo è esposto. Negli studi in vivo questi fenomeni costituiscono parte integrante del modello animale: in un approccio totalmente in vitro considerazioni legate alla cinetica devono necessariamente essere poste come step iniziale della valutazione, soprattutto in un processo di valutazione del rischio che abbia come punto di partenza la valutazione della esposizione interna. Ad esempio, la determinazione di assenza di assorbimento orale o cutaneo limita fortemente la necessità di procedere con test di tossicità più o meno complessi, potendo utilizzare approcci come la TTC (*Threshold of Toxicological Concern*), vale a dire la soglia per l'esposizione umana al di sotto della quale c'è una probabilità estremamente bassa che possa esserci un rischio per la salute. Tale approccio si può applicare a sostanze per le quali non siano disponibili dati di tossicità. Analogamente alla situazione in vivo sono di estrema importanza gli studi di caratterizzazione dei modelli in vitro e lo studio dei parametri biocinetici in termini di corrispondenza tra concentrazioni nominali utilizzate sperimentalmente e dosi di esposizione delle cellule. Le informazioni sulla cinetica sono quindi indispensabili nella traslazione delle informazioni fornite dal modello in vitro con la reale situazione di esposizione per l'uomo.

Molti sistemi non-animale di tossicocinetica sono ad un buon livello di sviluppo e caratterizzazione e sono spesso utilizzati come test complementari (come previsto anche dalla Linea Guida OCSE n°417). In alcuni casi, quali ad esempio l'escrezione renale e biliare così come l'assorbimento polmonare, lo sviluppo di metodi in vitro è molto meno avanzato e non ci sarà certamente entro la scadenza del 2013 (gli esperti hanno stimato in 5-7 anni il tempo ancora necessario per lo sviluppo di appropriati metodi). Una volta che saranno disponibili metodi validi per l'identificazione dei parametri relativi ai singoli step del processo ADME, sarà necessario disporre degli algoritmi in grado di integrare i dati in vitro-in silico: in questo contesto sono di fondamentale importanza modelli matematici come i PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetic models*) che permettono un'analisi quantitativa in funzione del tempo dei processi tossicocinetici e tossicodinamici di una sostanza. Si tratta di modelli computerizzati sviluppati su algoritmi che integrano informazioni sulla fisiologia di specie animali diverse, sulle proprietà chimico fisiche delle sostanze e sulla dose dipendenza delle reazioni biochimiche che

sono alla base di metabolismo ed escrezione. Per questa fase il gruppo non ha fatto previsioni.

### **Sensibilizzazione cutanea**

Questo endpoint tossicologico è strettamente correlato al fenomeno dell'allergia cutanea. I meccanismi biologici implicati, nonostante siano ben conosciuti, sono molteplici e interconnessi fra loro, contribuendo alla complessità e difficoltà di valutazioni a scopo predittivo per la salute dell'uomo soprattutto con metodologie in vitro. Gli stessi modelli animali finora utilizzati sono per lo più in grado di discriminare tra sostanze sensibilizzanti e non e solo un test (LLNA local lymph node assay) fornisce informazioni semi-quantitative sulla potenza di sensibilizzazione di una sostanza. Recentemente diversi metodi non-animale sono stati sviluppati per questo ambito tossicologico, ma, poiché singolarmente rappresentano solo parte dell'intero fenomeno, nessuno di questi è stato ancora formalmente validato. Mai come in questo caso infatti un approccio di studio completamente in vitro non può prescindere da una strategia di test combinati che ricostituisca la complessità di questo endpoint.

Al momento, per la maggior parte degli scenari di esposizione dei cosmetici, sono stati sviluppati alcuni test in vitro rappresentativi di parziali aspetti che contribuiscono a questo endpoint (ad esempio test di biodisponibilità, infiammazione epidermica, attivazione e migrazione delle cellule dendritiche, proliferazione di cellule T), ma non è stata ancora stabilita quale sia la loro combinazione ottimale la cui integrazione fornisca il quadro completo di informazioni necessarie. Gli esperti tossicologi dichiarano infatti che il 2013 non vedrà ancora una completa sostituzione dei modelli animali finora utilizzati, scadenza per la quale, una previsione ragionevolmente sicura non può essere posta prima del 2017-2019. Per questo motivo i dati disponibili in vitro possono essere utilizzati solo come supporto nelle decisioni in sede di valutazione del rischio.

### **Tossicità a dosi ripetute**

Con questo termine si indicano gli effetti tossici che si manifestano a seguito di esposizioni giornaliere ripetute nell'arco dell'intera vita (esposizione cronica) o per parte di essa (esposizione sub-cronica). Tale modalità di esposizione implica oltre all'intervento dei processi tossicocinetici, azioni combinate da parte di più tessuti ed organi sia in termini di effetti tossici che di distribuzione in un quadro generale di tossicità sistemica.

Essendo al momento stati sviluppati test in vitro in grado di predire effetti tossici (pericolo o hazard) solo su specifici organi bersaglio, è necessario sviluppare una strategia di testing con modelli in vitro/in silico che siano rappresentativi della interrelazione tra i vari fenomeni che realmente avvengono all'interno del corpo umano. Il gruppo ha sottolineato l'importanza già evidenziata dal gruppo sulla cinetica di sviluppare lo studio dei parametri biocinetici negli studi in vitro utilizzati per identificare la dose reale di esposizione delle cellule. In questo campo i metodi in corso di sviluppo sono potenzialmente utili nell'identificazione del pericolo in termini di meccanismi d'azione tessuto- o organo-specifici, ma le estrapolazioni in grado di fornire informazioni quantitative sulle relazioni dose-risposta e dose esterna/dose interna come effetto risultante di una esposizione ripetuta, potranno essere fatte solo con lo sviluppo di specifici algoritmi matematici come i modelli PBPK e PBPD (*Physiologically Based Pharmacodynamic model*). Anche in questo caso quindi la complessità dei meccanismi coinvolti derivante da effetti di tipo sistemico rende ancora lontana una completa sostituzione dei modelli animali finora utilizzati con metodi esclusivamente in vitro (in questo caso gli esperti non indicano previsioni se non la certezza nel superamento del 2013).

### **Carcinogenicità**

La carcinogenesi è un processo molto complesso che avviene in tempi relativamente lunghi attraverso la sequenza di più stadi e articolate interazioni tra diversi sistemi biologici. Inoltre per una stessa sostanza i meccanismi d'azione possono differire in diversi organi o in diverse specie animali. Considerando che il processo non è ancora completamente conosciuto e che per la sua complessità non può certamente essere riprodotto in toto da sistemi semplici ed isolati quali quelli in vitro, risulta difficile immaginare una completa sostituzione dei modelli animali in questo ambito di indagini tossicologiche se non rimanendo ad un livello di caratterizzazione del pericolo che esula però da valutazioni quantitative di rischio, imprescindibili dalle informazioni derivanti da relazioni dose-risposta. Anche in questo caso infatti gli esperti tossicologi non rimandano ad alcuna data previsionale per una valutazione basata esclusivamente su modelli in vitro.

### **Tossicità riproduttiva**

Questo endpoint tossicologico è estremamente difficile da studiare con metodi di "replacement", sia per la complessità dei meccanismi e delle loro

interconnessioni, ma anche per la complessità del processo stesso di sviluppo prenatale dell'uomo. Per queste ragioni, come d'altra parte per gli endpoint sopra considerati, solo modelli animali sono accettati come adeguati per valutazioni sulla sicurezza della salute in ambito regolatorio. In questa area di indagine i metodi in vitro sviluppati e validati, quali quelli per lo studio degli effetti di embriotossicità e di interferenza endocrina, sono in grado di coprire solo specifici e parziali aspetti dell'intero sistema riproduttivo. Al momento solo determinati meccanismi possono essere rappresentati in vitro, non esiste alcun singolo metodo alternativo o un sistema di questi in grado di sostituire i modelli animali, anche se dati in vitro sono comunque utilizzati con valenza di dati di supporto o di primo screening. Una promettente via che si sta percorrendo risulta l'implementazione di database che raccolgono informazioni tossicologiche provenienti da metodi classici animali e che possono individuare i meccanismi target più sensibili relativi alle varie sostanze tossiche per il sistema riproduttivo. Verosimilmente una completa raccolta di dati potrebbe portare all'individuazione di test in vitro che siano punti chiave di una strategia di test integrati in grado di fornire completezza di informazione nel contesto generale della tossicità riproduttiva. In ogni caso gli esperti non ne assicurano la disponibilità prima di 10 anni.

È quindi indubbio che il 2013 non vedrà una completa sostituzione dei modelli animali nelle valutazioni tossicologiche nell'ambito dei prodotti cosmetici poiché, come si è visto, per quegli endpoint più complessi non è di semplice attuazione il necessario stretto legame che deve esserci tra le esigenze etiche ed il rigore scientifico. In ambito regolatorio i metodi alternativi possono essere utilizzati al momento solo a scopo di screening e di supporto e potranno essere accettati solo dopo il superamento del lungo ed accurato processo di validazione che ne stabilisce la rilevanza per uno specifico ambito tossicologico e la loro affidabilità in termini di ripetibilità della performance.

A tutt'oggi la sperimentazione scientifica non può essere totalmente svincolata dal modello animale, poiché è l'unico in cui è possibile considerare le regolazioni omeostatiche dell'organismo in toto. Diversi sono i metodi alternativi validati che vengono usati in ambito regolatorio come ad esempio il test di sensibilizzazione cutanea Local Lymph Node Assay (metodo di "Refinement"), i metodi per la corrosione cutanea quali Epiderm EpySkin, (entrambi metodi di "Replacement"),

il test del Rosso neutro su cellule 3T3 per la fototossicità (metodo di "Replacement") e metodi di irritazione oculare (tutti metodi di "Reduction") per la classificazione degli irritanti severi (ma non utilizzabile per gli irritanti moderati per i chiari limiti mostrati in questo ambito) o il test di assorbimento cutaneo (metodo di "Replacement"). Altri metodi possono essere usati come supporto, contribuendo a ridurre i metodi in vivo comunque richiesti; questi test, pur non essendo ancora stati "pienamente" accettati in ambito regolatorio, possono essere usati come basi di conoscenza per mirare le condizioni sperimentali degli studi in vivo: ne sono un esempio gli studi di tossicocinetica, per cui lo svolgimento di una batteria di test in vitro permette una notevole riduzione degli animali utilizzati in test in vivo, non essendo necessari una serie di studi pilota, che normalmente venivano condotti prima del test regolatorio vero e proprio. Anche per quanto riguarda i test di tossicità acuta, richiesti per qualsiasi tipo di dossier di registrazione come primo stadio di valutazione tossicologica, sono state pubblicate tre diverse linee guida OCSE (TG 420, 423 e 425) che forniscono i protocolli sperimentali necessari per il calcolo della LD50 con forte riduzione del numero di animali utilizzati e/o della loro sofferenza nel mantenimento della significatività statistica del disegno sperimentale. Riassumendo, a tutt'oggi la maggior parte dei metodi alternativi validati sono metodi di "Reduction" e "Refinement", mentre per i metodi di "Replacement" sono stati validati solo quelli relativi ad effetti topici, per i quali le interrelazioni tra organi e i fenomeni cinetici hanno un peso minore. Come si è visto per gli endpoint più complessi (inclusa la sensibilizzazione cutanea) è la natura sistemica dei fenomeni implicati che determina le difficoltà di sviluppo di metodi prettamente in vitro verso una totale sostituzione dei modelli animali classici; difficoltà che potranno essere superate solo con un approccio integrato di batterie di test in vitro ed in silico attraverso algoritmi che descrivano le interazioni tra i diversi fenomeni tossicologici che singolarmente sono rappresentati dai vari sistemi sperimentali.

Al momento quindi i modelli animali sono ancora necessari per valutazioni di rischio in ambito regolatorio; è di questa opinione anche il Comitato Scientifico SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*) della DG-Sanco che, nella ultima versione della guida per il testing sui cosmetici (The SCCS'S Notes of Guidance for the testing of Cosmetic Ingredients and their Safety: [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_](http://ec.europa.eu/health/scientific_)

committees/consumer\_safety/index\_en.htm), afferma che le valutazioni per gli ingredienti dei cosmetici devono essere effettuate utilizzando dati in vivo e, ove disponibili, a supporto, dati in vitro, studi clinici ed epidemiologici e modelli computerizzati che mettono in relazione biunivoca la struttura chimica di un composto e la sua attività biologica (QSAR, *Quantitative Structure Activity Relationship*).

Il raggiungimento di una completa eliminazione dei modelli animali è un obiettivo purtroppo ancora lontano, ma la ricerca in questa direzione è in fervido divenire.

## Entro l'anno via alle nuove regole per la sperimentazione animale

**Marco Pivato**

(Università degli Studi di Bologna)

### Introduzione

Il Governo ha tempo fino al 10 novembre per recepire, come gli altri 26 Paesi dell'Unione Europea, la direttiva 2010/63/UE in tema di *Protezione degli animali utilizzati a fini scientifici*, che cancellerà la precedente 1986/609 e il relativo decreto legislativo 1992/116. Già il Trattato di Lisbona del 2009, in vigore da gennaio 2010, aveva sancito «l'obbligo per gli Stati membri di tenere conto, nella ricerca, [...] del benessere degli animali in quanto esseri senzienti»<sup>1</sup> e aveva impegnato il Governo a favorire «lo sviluppo di metodi di ricerca che non facciano uso di animali»<sup>2</sup>. Nel 2013 toccherà ai test cosmetici: l'Europa sarà chiamata, un'altra volta, a rivedere le norme sull'utilizzo degli animali. In Italia l'iter parlamentare per il recepimento della 2010/63/UE è cominciato. Il testo del Parlamento e del Consiglio europei, che si trova per esteso in Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea dal 20 ottobre 2010<sup>3</sup>, è stato istruito, dalle commissioni Affari sociali e Politiche comunitarie, in un decreto legislativo già l'anno scorso, ma da allora è stato preso di mira da una serie di emendamenti, nell'interesse delle associazioni di animalisti, volti a rendere la direttiva più restrittiva. Dunque, l'Italia non recepirà la direttiva europea esattamente così come licenziata a Bruxelles, ma seguendo le segnalazioni che, da qui a novembre, le camere tenderanno di inserire nel decreto legislativo che le commissioni apposite consegneranno

definitivamente al Governo.

### I criteri del decreto legislativo (art. 25)<sup>4</sup>

Di seguito le linee originali, alla data del 26 luglio 2011, con cui ispirare il decreto italiano che a sua volta dovrà istruire il Governo per recepire la direttiva.

a) Prevedere ogni iniziativa idonea per garantire sistemi alternativi per la sperimentazione e la ricerca scientifica, al fine di limitare ai soli casi di oggettiva e comprovata necessità la possibilità di utilizzare animali a fini di ricerca scientifica, garantendo l'implementazione dei metodi alternativi al fine di contribuire allo sviluppo e alla validazione degli stessi e allo scopo di formare personale esperto nelle tecniche dei metodi alternativi; assicurare l'osservanza e l'applicazione del principio delle tecniche alternative mediante la presenza di un esperto in metodi alternativi all'interno di ogni organismo preposto al benessere degli animali e nel Comitato nazionale per la protezione degli animali impiegati a fini scientifici previsto dalla direttiva.

b) Disporre l'avvio di iniziative finalizzate a limitare gli allevamenti destinati a ospitare animali a fini di sperimentazione, prevedendo, per gli allevamenti già esistenti, ogni forma di garanzia per tutelare il ripristino del benessere degli animali ospitati nelle predette strutture e utilizzati a fini di ricerca per non pregiudicare, per gli stessi, la possibilità di una futura adozione.

c) Vietare l'utilizzo di scimmie antropomorfe, cani, gatti e specie in via d'estinzione, a meno che non risulti obbligatorio in base a legislazioni o a farmacopee nazionali o internazionali o non si tratti di ricerche finalizzate alla salute delle specie coinvolte.

d) Assicurare una misura normativa che tuteli gli organismi geneticamente modificati, tenendo conto della valutazione del rapporto tra danno e beneficio, dell'effettiva necessità della manipolazione e dell'impatto che potrebbe avere sul benessere degli animali, anche vietando taluni fenotipi.

e) Vietare qualsiasi procedura qualora causi dolore, sofferenza o angoscia intensi che possano protrarsi e non possano essere opportunamente alleviati.

f) Assicurare un sistema ispettivo che garantisca il benessere degli animali da laboratorio, adeguatamente documentato e verificabile, al fine

Nota 1:

Camera dei deputati, Resoconti dell'Assemblea, seduta n. 390 del 28/10/2010 (Allegato B).

Nota 2:

Idem

Nota 3:

Reperibile anche in italiano su <http://eur-lex.europa.eu> - legislatura 276, pp. 33-79. Link diretto: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:IT:PDF>

Nota 4:

Camera dei deputati, Resoconti dell'Assemblea, Seduta n. 507 del 26/07/2011.

di promuovere la trasparenza, con ispezioni senza preavviso.

g) Predisporre una banca dati telematica presso il Ministero della Salute per la raccolta di tutti i dati relativi all'utilizzo degli animali in progetti per fini scientifici o tecnologici e dei metodi alternativi.

h) Definire un quadro sanzionatorio appropriato tale da risultare effettivo, proporzionato e dissuasivo anche in riferimento al titolo IX-bis del libro secondo del codice penale.

Dall'attuazione del presente articolo non devono derivare nuovi o maggiori oneri per la finanza pubblica. Le amministrazioni interessate provvedono all'adempimento dei compiti derivanti dall'attuazione del decreto legislativo con le risorse umane, strumentali e finanziarie disponibili a legislazione vigente.

### Regole ferree, ma agli animalisti ancora non piace

Sebbene la comunità scientifica possa percepire la direttiva in senso restrittivo, le associazioni di animalisti la considerano, invece, addirittura lacunosa e permissiva. È così anche secondo numerosi attori politici: l'eurodeputato e vicepresidente dell'Intergruppo sul benessere degli animali al Parlamento europeo Andrea Zanoni (IdV) ha rilevato che: «la normativa comunitaria prevede requisiti minimi da rispettare nei centri di ricerca, ma questi requisiti non sono obbligatori»<sup>5</sup>. E specifica: «l'articolo 44 della direttiva 2010/63/UE [...] recita che l'autorità competente "può" revocare l'autorizzazione del progetto - centro, ndr - se questo non viene realizzato in conformità con quanto disposto nell'autorizzazione, ma non "deve", ed è per questo che la decisione di chiusura può essere presa solo dall'autorità nazionale»<sup>6</sup>. L'argomento ha così rinvigorito i mal di pancia delle associazioni animaliste, soprattutto in concomitanza con la mobilitazione contro l'allevamento di cani beagle da laboratorio Green Hill di Montichiari, nel bresciano.

Un caso che è arrivato anche a Montecitorio. Tanto che l'on. Michela Brambilla (Pdl) ha disposto, a integrazione dell'art. 25, le richieste contenute nel seguente emendamento:

a) Garanzia dell'implementazione di metodi alternativi all'uso di animali a fini scientifici, destinando all'uopo congrui finanziamenti; formare personale esperto nella sostituzione degli animali con metodi in vitro, nel miglioramento

delle condizioni sperimentali (principio delle 3R)<sup>7</sup>, anche tramite corsi di approfondimento all'interno di centri di ricerca e Università integrandone il piano di studi, senza nuovi o maggiori oneri a carico della finanza pubblica. Inoltre, assicurare l'osservazione e applicazione del principio delle 3R grazie alla presenza di un esperto in metodi alternativi e di un biostatistico all'interno di ogni organismo preposto al benessere degli animali e del Comitato nazionale per la protezione degli animali usati a fini scientifici.

b) Vietare l'utilizzo di scimmie antropomorfe, cani, gatti e specie in via d'estinzione a meno che non risulti obbligatorio da legislazioni o da farmacopee nazionali o internazionali o non si tratti di ricerche finalizzate alla salute dell'uomo o delle specie coinvolte, condotte in conformità ai principi della direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, previa autorizzazione del Ministero della salute, sentito il Consiglio Superiore di Sanità.

c) Vietare l'allevamento di primati, cani e gatti destinati alla sperimentazione di cui alla lettera b) su tutto il territorio nazionale.

d) Assicurare una misura normativa sufficientemente cautelare nei confronti degli animali geneticamente modificati, tenendo conto della valutazione del rapporto tra danno e beneficio, dell'effettiva necessità della manipolazione, del possibile impatto che potrebbe avere sul benessere degli animali e valutando i potenziali rischi per la salute umana, animale e l'ambiente.

e) Vietare l'utilizzo di animali negli ambiti sperimentali di esercitazioni didattiche, ad eccezione dell'alta formazione dei medici e dei veterinari, ed esperimenti bellici.

f) Vietare gli esperimenti che non prevedono anestesia o analgesia, qualora provochino dolore all'animale.

g) Assicurare un sistema ispettivo che garantisca il benessere degli animali da laboratorio, adeguatamente documentato e verificabile, al fine di promuovere la trasparenza, con un numero minimo di due ispezioni all'anno, di cui una effettuata senza preavviso.

f) Predisporre una banca dati telematica per la raccolta di tutti i dati relativi all'utilizzo degli animali in progetti per fini scientifici o tecnologici e dei metodi alternativi.

h) Definire un quadro sanzionatorio appropriato in modo da risultare effettivo, proporzionato e

#### Pagina 6

##### Nota 5:

Ansa, 02/02/2012.

##### Nota 6:

Idem

##### Nota 7:

Replacement: sostituzione con metodi alternativi.

Reduction: riduzione del numero di animali.

Refinement: miglioramento delle condizioni degli animali.

#### Pagina 7

##### Nota 8:

Sesta ed ultima relazione sulle statistiche riguardanti il numero di animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici negli Stati membri dell'Unione Europea.

Elaborazione grafica a cura della Commissione Europea, Bruxelles, 08/12/2010.

##### Nota 9:

S. Garattini, Lettera aperta.

La sperimentazione necessaria, in «Scienza in rete - gruppo 2003 per la ricerca», 29/10/2011

dissuasivo.

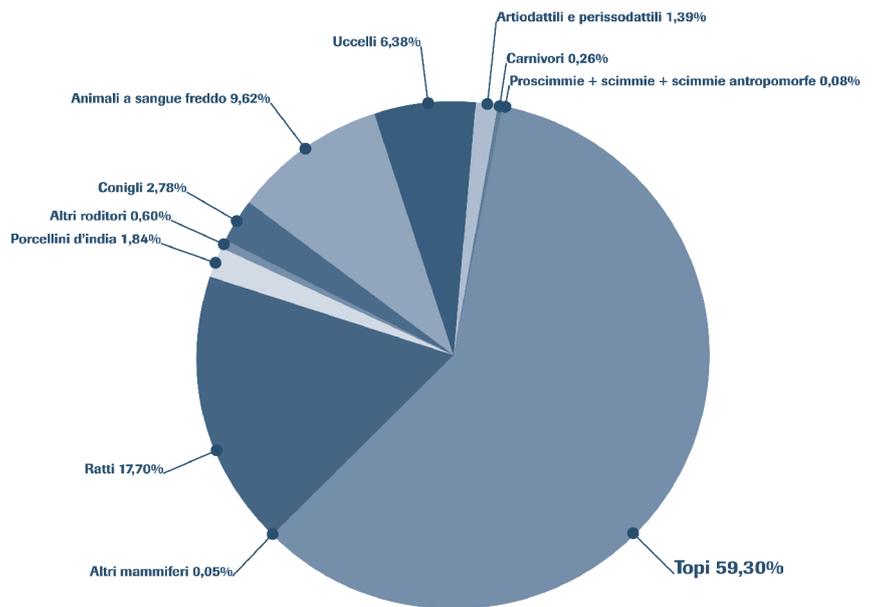
**La sperimentazione in numeri: tipologie di animali e finalità\***

Secondo l'ultima relazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento europeo, nel 2008, gli animali utilizzati a fini sperimentali e ad altri fini scientifici, nei 27 Stati membri della Ue, sono stati complessivamente poco più di 12 milioni. Come nelle relazioni precedenti, i roditori e i conigli rappresentano oltre l'80 per cento del numero totale di animali utilizzati. I topi sono di gran lunga la specie più utilizzata, con una percentuale del 59,3 per cento del totale, seguiti dai ratti con il 17,7 per cento. Come negli anni precedenti la seconda categoria di animali più utilizzata è costituita dagli animali a sangue freddo, in particolare rettili, anfibi e pesci, che rappresentano il 9,62 per cento. La terza categoria è costituita dagli uccelli, con una percentuale di poco superiore al 6,3 per cento del totale. Il gruppo degli artiodattili e dei perissodattili, che comprende cavalli, asini e ibridi (perissodattili) nonché suini, caprini, ovini e bovini (artiodattili), rappresenta l'1,39 per cento del totale degli animali utilizzati negli Stati membri. I carnivori costituiscono lo 0,26 per cento e i primati non umani lo 0,08 per cento del numero totale di animali utilizzati nel 2008.

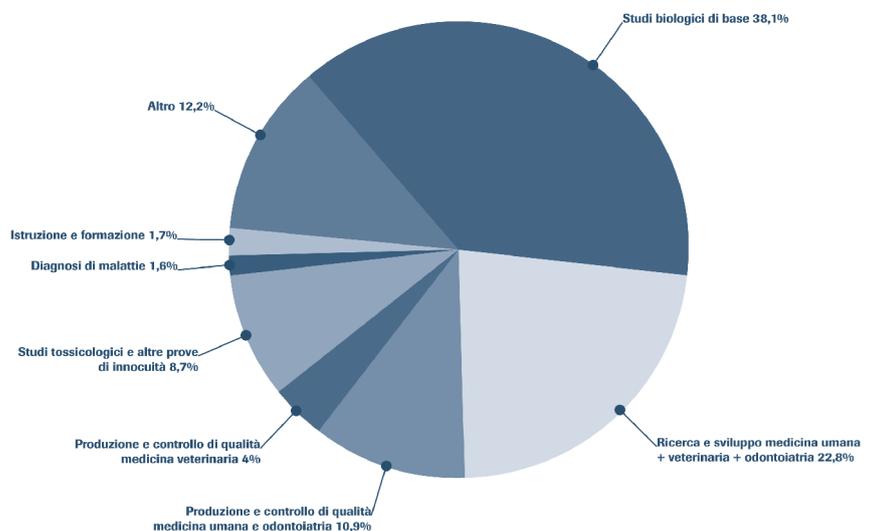
Più del 60 per cento degli animali è stato utilizzato in attività di ricerca e sviluppo per la medicina umana, la medicina veterinaria, l'odontoiatria e per studi biologici di base. La produzione e il controllo di qualità di prodotti e dispositivi destinati alla medicina umana, veterinaria e all'odontoiatria hanno richiesto l'uso del 14,9 per cento del numero totale di animali. Gli studi tossicologici e altre prove di innocuità hanno rappresentato l'8,7 per cento del totale degli animali utilizzati a fini sperimentali.

**Il dibattito pubblico sulla sperimentazione animale**

Già Silvio Garattini, dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, il 29 ottobre 2011, all'indomani della presa di posizione dell'ex ministro del Turismo Brambilla, metteva nero su bianco alcuni punti<sup>9</sup>: «C'è accanimento contro l'impiego degli animali senza alcun bilanciamento da parte di chi fa ricerca, non per divertimento ma nella speranza di dare sollievo alla sofferenza degli ammalati e trovare rimedi per tante malattie senza cura»; «Si gioca molto sull'emotività anziché far conoscere le condizioni in cui oggi si sperimenta nel pieno rispetto della legislazione e con molteplici controlli»; «Gli stessi politici quando



**Grafico 1 - Tipologie.**



**Grafico 2 - Finalità.**

hanno un problema di salute fanno certo ricorso ai farmaci, dimenticando che la disponibilità di trattamenti efficaci è sempre passata attraverso la sperimentazione animale»; «Enfatizzare il ruolo dei metodi alternativi è contraddittorio: se si considera che gli animali sono un modello imperfetto dell'uomo, a maggior ragione lo saranno poche cellule coltivate in provetta». Non è raro rilevare che la cittadinanza si esprima in tema di ricerca scientifica prevalentemente quando sia intesa a limitarla. Del resto secondo Eurobarometro, il servizio per sondaggi e analisi della Commissione europea, il gradimento degli italiani nei confronti degli strumenti per l'innovazione è costante e negativo. Ma mentre voci come nucleare o Ogm hanno lievi margini favorevoli, la sperimentazione animale ha ben pochi sostenitori, sebbene il suo scopo sia a beneficio della collettività. Eurispes, nel *Rapporto Italia 2012*, recentemente pubblicato, riporta che l'86,3 per cento degli italiani è contrario alla sperimentazione animale<sup>10</sup>. Le associazioni animaliste scendono in piazza (weekend di marzo) per raccogliere firme per due eventi distinti: ottenere ulteriori emendamenti al recepimento della direttiva 2010/63/UE e lo stop definitivo ai test cosmetici su animali. Da Rai 1, in gennaio, Giuliano Ferrara commenta la direttiva 2010/63/UE sostenendo che «gli animali non sono uomini, purtroppo riflesso della gentilezza con cui ci rapportiamo con il prossimo» e che quindi «è importante che il Parlamento si occupi di limitarne lo sfruttamento»<sup>11</sup>. Il primo febbraio LAV (Lega Anti Vivisezione) e altre associazioni di animalisti hanno fatto fronte comune, al Convegno Ricerca: *l'Italia non perda il treno per una scienza sicura e senza animali. I principi e i criteri direttivi per l'attuazione della direttiva europea*, alla Camera dei Deputati. Un incontro che ha visto anche rappresentanti del Ministero della Salute, oltre al professor Eugenio Picozza, cassazionista e docente di diritto amministrativo alla Facoltà di Giurisprudenza dell'Università degli Studi di Roma. L'emendamento Brambilla è stato approvato, e in febbraio è arrivato il primo sì da parte della Camera<sup>12</sup> al decreto sul testo che, se ratificato in toto, comporterà significativi cambiamenti al corso della ricerca scientifica, ma certamente ancora polemiche. Non solo in Parlamento ma anche fuori delle aule, dove le associazioni di animalisti marciano sui media con specifiche iniziative rivolte al pubblico. In testa LAV, ma anche ENPA (Ente Nazionale Protezione Animali), I-Care Italia, Lega Nazionale

per la Difesa del Cane, Limav (Lega Internazionale Medici per l'Abolizione della Vivisezione) e Oipa (Organizzazione Internazionale Protezione Animali). C'è ancora tempo per la ratifica della direttiva 2010/63/UE, ma il 2012 vedrà contrapposti schieramenti in una battaglia impari giacché, in Parlamento, i portatori di interessi dei diritti degli animali sono in larga maggioranza rispetto ai portatori di interessi dei diritti della ricerca scientifica. E anche fuori del Parlamento: torna di frequente nelle argomentazioni dei cronisti la presunta non scientificità dell'estrapolazione dei risultati dei test dall'animale all'uomo, mentre nello spazio "commenti" dedicato ai lettori, sui siti on-line dei maggiori quotidiani italiani, tornano allusioni a laboratori-lager, a ricercatori-Mengele e allo strapotere della lobby industriale che nella vivisezione troverebbe sfogo a disturbi variamente nominati. Prevale forse una visione distorta sulla sperimentazione, su come venga condotta e soprattutto su cosa serva? L'attuazione della direttiva è una problematica non puramente scientifica, ma anche politica e civile, che lascia, per ora in sospeso, un altro interrogativo: con quali mezzi le società scientifiche possono ambire a intervenire sull'agenda della politica e sulla percezione pubblica delle loro missioni?

## 16° Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia

Giardini Naxos, 21-23 marzo 2012

## Valutazione del rischio ambientale nell'ambito della regolamentazione REACH

**Davide Sangalli**

(Laboratorio di Tossicologia, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Milano)

La valutazione del rischio ambientale è parte integrante del dossier di registrazione delle sostanze chimiche secondo il regolamento REACH (regolamento CE n. 1907/2006 del parlamento europeo e del consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze

Nota 10:

Adnkronos Salute, 26/12/2011.

Nota 11:

Qui Radio Londra, 20.30 del 19/01/2012

Nota 12:

La Camera ha approvato con 380 voti a favore, e 20 contrari. Astenuti: 54 (01/02/2012)

chimiche).

L'obiettivo della valutazione del rischio ambientale è quello di effettuare una valutazione quantitativa degli effetti della sostanza sull'ambiente. Il rischio viene calcolato attraverso il rapporto tra la concentrazione della sostanza, sotto la quale non si hanno effetti avversi nella sfera ambientale, PNEC (Predicted No Effect Concentration), e la concentrazione della sostanza prevista in ambiente, PEC (Predicted Environmental Concentration) e risulta essere controllato quando il rapporto è inferiore ad uno; in caso contrario, si deve procedere alla revisione degli scenari di esposizione o al recupero di dati più dettagliati sulle proprietà della sostanza.

In accordo con tale regolamento, l'iter di valutazione del rischio ambientale è diverso in base alla pericolosità della sostanza in esame. Se la sostanza non è classificata come pericolosa secondo il regolamento CLP (regolamento CE n. 1272/2008 del parlamento europeo e del consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele) il processo di valutazione del rischio termina con il calcolo delle dosi di non effetto per l'ambiente e per l'uomo. Se la sostanza è classificata come pericolosa il processo di valutazione richiede l'integrazione di due steps che prevedono l'identificazione degli scenari di esposizione con il calcolo della concentrazione prevista ambientale e il calcolo del rischio, dato dal rapporto tra la concentrazione prevista in ambiente e la concentrazione di non effetto.

Per evidenziare meglio le differenze nelle due casistiche, mettiamo a confronto i processi di registrazione di due sostanze a differente pericolosità: il biodiesel, miscela di metil-esteri di acidi grassi a lunga catena, e la malachite green, colorante organico della famiglia dei trifenilmetani.

In un primo momento si valutano le caratteristiche chimico fisiche e la degradazione delle sostanze al fine di prevederne il comportamento in ambiente. Il biodiesel presenta un'alta lipofilia ed una bassissima solubilità in acqua (<0,023mg/L), a temperatura ambiente si trova allo stato liquido ed ha una pressione di vapore molto bassa. Di conseguenza si può prevedere una distribuzione di tale miscela principalmente nel suolo e nei sedimenti. Il tempo di permanenza in ambiente dei metil-esteri di acidi grassi è molto breve in quanto vengono facilmente digeriti dall'ambiente

attraverso processo biodegradativi (T1/2=4 giorni) che portano alla mineralizzazione della sostanza.

La malachite green è un sale ad alta solubilità in acqua (>40 g/L) e bassa affinità per le matrici organiche, la distribuzione in ambiente sarà principalmente a carico di matrici a base acquosa. I processi biodegradativi trasformano la malachite green in composti ridotti demetilati resistenti ai processi degradativi ambientali. Non ci sono prove che la malachite green sia degradata da processi idrolitici, mentre alcuni studi ne hanno evidenziato la degradazione per foto-trasformazione. Questo processo in ambiente è significativo solamente per il suolo superficiale e per gli strati superiori dei bacini idrici, di conseguenza è prevedibile che la malachite green o comunque i suoi derivati siano persistenti in ambiente per lungo tempo.

Le previsioni effettuate sono state confermate dall'utilizzo di modelli previsionali secondo i quali la distribuzione del biodiesel è principalmente a carico del suolo e dei sedimenti per sedimentazione del particolato sospeso, mentre la malachite green è quasi esclusivamente distribuita in acqua.

Gli studi di distribuzione e persistenza in ambiente sono fondamentali per impostare una strategia di indagine volta a verificare la tossicità delle due sostanze e valutare i casi in cui è possibile effettuare data waiving e quindi non eseguire test inutili e scientificamente ingiustificati. Il regolamento REACH prevede infatti la possibilità di non eseguire studi ed ulteriori indagini tossicologiche relativi a compartimenti ambientali nel caso in cui sia esclusa la possibilità di esposizione. Questo comporta un notevole risparmio sia economico da parte delle aziende sia di animali sottoposti ai tests.

Il secondo passaggio del processo di valutazione del rischio è concentrato sulla valutazione dei dati tossicologici relativi alle sostanze al fine di verificarne la tossicità intrinseca.

Il regolamento REACH prevede che all'aumento del tonnellaggio annuo di produzione o utilizzo della sostanza per singolo sito, si devono avere a disposizione informazioni tossicologiche sempre più dettagliate. L'allegato VII del regolamento riporta le informazioni standard per le sostanze fabbricate od importate in quantitativi pari o superiori ad 1 tonnellata. Gli allegati VIII, IX, X riportano le informazioni aggiuntive necessarie qualora la sostanza fosse fabbricata od importata in quantitativi rispettivamente superiori a 10, 100,

1000 tonnellate l'anno.

Nel caso del Biodiesel le informazioni tossicologiche relative ai diversi livelli trofici acquatici (alghe unicellulari, invertebrati, pesci) confermano la non pericolosità della sostanza. Gli organismi sottoposti ai tests hanno sopportato alte concentrazioni di esposizione alla sostanza, di conseguenza si può confermare la non classificazione della sostanza come pericolosa per l'ambiente acquatico. Anche i tests tossicologici eseguiti su microrganismi acquatici hanno evidenziato la non pericolosità della sostanza, i batteri sono in grado di crescere utilizzando il biodiesel come unica fonte di carbonio. Considerando l'alta degradabilità della sostanza non si è ritenuto necessario eseguire test di tossicità a lungo termine; inoltre è stato effettuato data waiving per i tests di tossicità su organismi del suolo e dei sedimenti in quanto non si prevede esposizione per questi compartimenti secondo gli usi per cui la sostanza è utilizzata.

La malachite green in passato era utilizzata non solo come colorante, ma anche come fungicida in ambienti di acquacoltura e, per questo motivo, sono stati eseguiti dagli anni '70 in poi innumerevoli studi di tossicità su organismi acquatici di livelli trofici diversi. Tutte le informazioni sono concordi nel dimostrare un'alta tossicità sia a breve che a lungo termine con un NOEC <1 mg/L che ne conferma la classificazione in accordo con il regolamento CE 1272/2008 come "Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata". Anche in questo caso non si è ritenuto necessario effettuare tests tossicologici su organismi del suolo e dei sedimenti in quanto secondo gli studi di ripartizione ambientali se ne esclude la possibilità di esposizione.

Dai dati tossicologici si procede al calcolo della PNEC ossia la concentrazione della sostanza chimica, in ogni compartimento, sotto la quale non sono accettati effetti avversi sull'ecosistema e sugli organismi che ci vivono, per esposizioni a lungo e breve termine. La sensibilità di un ecosistema è, generalmente, maggiore rispetto alla sensibilità di un singolo organismo sul quale viene effettuato un test in laboratorio. Per questo motivo vengono utilizzati dei metodi di estrapolazione attraverso i quali è possibile avere più realismo nella stima della concentrazione di non effetto. Qualora siano presenti dati tossicologici relativi al compartimento il calcolo viene effettuato utilizzando l'assessment factor method, che prevede l'applicazione di un fattore di correzione basato sul numero e tipologia

dei dati disponibili. Qualora non siano presenti dati tossicologici relativi al compartimento la stima della concentrazione di non effetto viene effettuata per estrapolazione dalla PNEC acqua utilizzando l'equilibrium partitioning method che richiede, come dato di input oltre alla PNEC acqua, il coefficiente di ripartizione particolato sospeso/acqua. Questo metodo si basa su alcune approssimazioni: la sensibilità degli organismi che vivono nel compartimento è paragonabile a quella degli organismi acquatici, la concentrazione della sostanza nel compartimento, nell'acqua interstiziale e negli organismi è in equilibrio termodinamico.

Essendo confermata la non pericolosità del biodiesel per l'ambiente il processo termina qui, mentre per la malachite green si deve procedere con la creazione degli scenari di esposizione cioè l'insieme delle condizioni che descrivono il modo in cui è possibile controllare i rischi associati all'uso o agli usi identificati di una certa sostanza. In base a questo viene calcolata la PEC ossia la concentrazione ambientale prevista della sostanza, su scala locale, regionale e continentale.

## Sicurezza d'uso e globalizzazione

**Emanuela Testai**

*(Istituto Superiore di Sanità, Roma)*

La globalizzazione, vale a dire l'insieme di processi che hanno portato ad un aumento esponenziale della connessione e della interdipendenza dei mercati e delle economie, fa ormai parte della nostra vita quotidiana. Negli ultimi venti anni grazie ai progressi tecnologici che hanno reso più facili le comunicazioni internazionali, gli affari e gli spostamenti di persone e merci, il processo è letteralmente esploso. Le interconnessioni dei mercati e delle economie hanno aumentato le possibilità di scelta da parte del consumatore, ma anche ovviamente la competizione da parte dei produttori: chi è favorevole senza riserve al processo sottolinea come la competizione possa portare ad una migliore efficienza nella produzione. Chi è contrario controbatte che prezzi più bassi spesso si ottengono a discapito della qualità del prodotto, con possibili problemi per la salute umana e per l'ambiente, la cui qualità non c'è dubbio che abbia un impatto sulla salute.

Alcuni sociologi hanno osservato che nell'era moderna la produzione di benessere sociale va sistematicamente a braccetto con la produzione di rischi, spesso nuovi e perciò più difficilmente identificabili e controllabili da parte delle Autorità Competenti: chiunque può ormai acquistare merci (farmaci inclusi) via web, e sono tristemente note per essere arrivate alla ribalta della stampa nazionale vicende come quelle relative all'uso di oggetti in pelle, importati dalla Cina, trattati con un antimuffa non ammesso all'uso in Europa perché sensibilizzante cutaneo, con gravi effetti per i consumatori che ne sono venuti in contatto. E proprio i possibili fattori di rischio per la salute e i relativi problemi tossicologici derivanti dalla globalizzazione delle merci unitamente ai fenomeni di contraffazione e contaminazione dovuti alla scarsa qualità dei prodotti in vari settori di impiego (fitosanitari, farmaci, cosmetici, prodotti di consumo, integratori) saranno presentati durante il simposio

## Farmaci biosimilari e comparabilità: problematiche emergenti nell'utilizzo dei farmaci biosimilari

**Carlo Pini e Annarita Meneguz**  
(Istituto Superiore di Sanità, Roma)

La definizione di prodotto biosimilare è chiaramente data nell'articolo 10 (4) della Direttiva 2001/83 e successivi emendamenti ed è stato chiaramente recepito nel decreto legislativo 219 che definisce l'argomento all'articolo 10 punto 7 come segue:

Quando un medicinale biologico simile a un medicinale biologico di riferimento non soddisfa le condizioni della definizione di medicinale generico a causa, in particolare, **di differenze attinenti alle materie prime o di differenze nei processi di produzione del medicinale biologico e del medicinale biologico di riferimento**, il richiedente è tenuto a fornire i risultati delle appropriate prove precliniche o delle sperimentazioni cliniche relative a dette condizioni.

Pertanto, da quanto sopra esposto, appare chiaro che nella maggior parte dei casi occorrerà condurre un confronto tra prodotto di riferimento e prodotto biosimilare sicuramente a livello di qualità, a livello

di non clinica e clinica, per poter concludere che la biosimilarità ipotizzata sia davvero dimostrata. Uno degli aspetti critici per i farmaci biosimilari è perciò legato al risultato del confronto a livello della qualità tra prodotto di riferimento e prodotto copia. Dai risultati di questo confronto preliminare, che può avvenire anche in una fase iniziale del processo di sviluppo, è possibile prevedere il percorso successivo che deve essere compiuto per completare lo sviluppo del farmaco biosimilare. Al fine di meglio comprendere le difficoltà di applicare il semplice concetto di medicinale generico ai farmaci biologici/biotecnologici, è obbligo ricordare che tali prodotti sono macromolecole, in alcuni casi a struttura quaternaria, con modifiche post-traduzionali importanti (ad es. glicosilazione). La caratterizzazione biochimica e biofisica può essere effettuata su base comparativa solo con grande difficoltà (ad es. disponibilità del farmaco originatore non formulato per poter effettuare le analisi necessarie). Inoltre deve essere tenuto sempre in considerazione il fatto che le caratteristiche di un farmaco biologico sono molto legate al processo di produzione, e che quello dell'originatore spesso non è noto. Infine le proprietà immunogeniche del prodotto biosimilare a confronto con il prodotto originatore rappresentano un aspetto importante e non prevedibile su semplici analisi strutturali. Per un farmaco biologico/biotecnologico l'impatto pratico di questi cambiamenti è in genere notevole. Ad esempio, cambiamenti nel processo di produzione, cambiamenti a livello di formulazione e filling, di eccipienti, di attrezzature, condizioni di trasporto, batch size definition, Shelf life, Container/closure system, condizioni di conservazione, condizioni di trasporto, ecc. possono avere un forte impatto sul prodotto e sugli studi con esso già condotti sino al punto da mettere in discussione l'utilizzo dei risultati non clinici e clinici già ottenuti prima della introduzione del cambiamento stesso. Tutto questo processo è basato sull'esercizio della comparabilità, che deve essere condotto secondo le linee guida disponibili, e che deve dimostrare se nell'ambito dello stesso prodotto, variazioni di processo portano a differenze significative nel prodotto stesso.

L'esercizio di comparabilità (*Comparability exercise*) si basa su quanto definito a livello di Linee Guida ICH e riguarda come abbiamo detto sopra la gestione del cambiamento all'interno di un singolo Marketing Authorization Holder. Da

questo esercizio, ristretto a livello ICH alla sola comparabilità a livello dei cambiamenti introdotti da un singolo produttore, si è passato a livello europeo a valutare con lo stesso approccio la possibilità che un farmaco sia “biosimile” rispetto ad un originatore già autorizzato. In altre parole, se è possibile dimostrare che due prodotti sono confrontabili tra loro nell’ambito dello stesso MAH (esercizio della comparabilità come da ICH), è possibile, in teoria, anche effettuare lo stesso esercizio utilizzando un prodotto “originatore” e dimostrare che un prodotto “copia” è ad esso identico, introducendo il concetto che dalla “Comparability” si possa arrivare alla dimostrazione della “Biosimilarity”. Come accennato gran parte delle problematiche si sono riversate a livello dell’EMA, in particolare a livello di Scientific Advice. L’approccio EMA, basato sull’utilizzo del noto concetto del “comparability exercise” sopra descritto, è sviluppato utilizzando Documenti (Linee Guida e Concept Paper) elaborati dall’EMA, sia come documenti di tipo generico (che definiscono la policy per i prodotti biosimili), sia come prodotti modulo CTD-specifici (che si riferiscono a problemi specifici legati ad aspetti peculiari della dimostrazione della biosimilarità nell’ambito della qualità, non clinica e clinica) sia infine come documenti “Prodotto - specifici”, quali l’eritropoietina, l’ormone della crescita, il G-CSF, l’insulina, l’interferone. Infine, altri documenti EMA relativi alla problematica della biosimilarità sono specifici per un definito importante problema trasversale, quale ad esempio la valutazione della immunogenicità a livello di un farmaco biosimilare a confronto con l’originatore.

Un certo numero di farmaci biosimilari ha ormai ottenuto la Marketing Authorisation, e molti altri si stanno affacciando all’orizzonte della scadenza dei brevetti dei potenziali originatori. Si ritiene opportuno sottolineare che il farmaco biosimilare viene registrato a livello europeo con un processo identico a quello che viene seguito da ogni altro farmaco biotecnologico, con la stessa accuratezza e puntualità nelle valutazioni dei vari pool di esperti. Il farmaco biosimilare fornisce pertanto le stesse identiche garanzie di un farmaco originatore già autorizzato. In secondo luogo, i farmaci biosimilari, al pari degli altri farmaci biologici/biotecnologici, non andrebbero mai intercambiati nello stesso soggetto, per ragioni legate alla farmacovigilanza e alla complessa natura di tali farmaci. È altresì ovvio che in fase iniziale, per soggetti mai trattati

precedentemente, un farmaco originatore ed un farmaco biosimilare possono essere utilizzati indifferentemente, salvo poi mantenere appunto lo stesso prodotto nel tempo, a conferma della qualità, sicurezza ed efficacia di questi medicinali.

## Reazioni avverse ai farmaci

**Maura Lodovici**

*(Università degli Studi di Firenze)*

Con l’aumento del consumo dei farmaci si è verificato parallelamente un aumento delle reazioni avverse a farmaci. Queste reazioni sono numerose e costituiscono uno dei maggiori problemi di salute pubblica nei paesi industrializzati; da vari studi della letteratura risulta che una percentuale fra il 2 e l’8% della popolazione abbia presentato ADR e che il 3-5% dei ricoveri ospedalieri siano da mettere in correlazione con le ADR. Tra i fattori di rischio bisogna considerare il sesso (infatti le ADR sono più frequenti nelle donne, anche perché le sperimentazioni cliniche vengono condotte essenzialmente nei maschi) e l’età, le ADR sono rare nei bambini e negli anziani, e più frequenti tra i soggetti con età compresa fra 20 e 40 anni.

Il sistema italiano della segnalazione spontanea, che dal 1965 in avanti è stato oggetto di numerosi interventi legislativi, ha avuto una svolta nel 2001 con la creazione della Rete Nazionale di Farmacovigilanza, basata sull’inserimento delle segnalazioni di tutte le sospette reazioni avverse a farmaci in un sistema web based da parte dei Responsabili di farmacovigilanza di ASL, Aziende Ospedaliere e IRCCS. Con cadenza bimestrale viene inviato ai medici un bollettino di informazione sui farmaci dove sono segnalati anche gli aggiornamenti di farmacovigilanza. Nonostante questo, questa parte della farmacologia ha necessità di essere investigata di più e le conoscenze acquisite di essere maggiormente diffuse. Quindi, è fondamentale in un congresso di Tossicologia l’organizzazione di un Simposio sulle ADR provocate da tutti i farmaci, sia quelli molto utilizzati che quelli il cui uso è meno frequente. Inoltre, per quanto riguarda l’uso dei fitoterapici, la vigilanza per il loro uso è ancora più importante, dal momento che sono oggi molto utilizzati in ampi strati della popolazione e che si possono ottenere senza una prescrizione medica, sia attraverso farmacie, erboristerie e supermercati come integratori alimentari. Anche la fitovigilanza

sarà argomento del Simposio insieme ad una interessante relazione che si focalizza sul dolore come evento avverso.

## **Meccanismi Molecolari di Tossicologia. Stress Ossidativi e Cancerogenesi**

**Maura Lodovici**

*(Università degli Studi di Firenze)*

Lo stress ossidativo è coinvolto in molte patologie degenerative e non degenerative quali cancro, diabete, Alzheimer etc. oltre a svolgere un ruolo fondamentale nel meccanismo d'azione di molte sostanze ed agenti tossici. Quindi non poteva mancare in un Congresso di Tossicologia un Simposio riservato allo stress ossidativo in associazione al processo infiammatorio ed in ultimo alla cancerogenesi. Lo stress ossidativo insorge quando c'è uno squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS, prodotte principalmente durante la respirazione cellulare) e la capacità dell'organismo alla loro rimozione attraverso un complesso sistema antiossidante. Durante il processo infiammatorio, insieme ad una cascata di mediatori quali citochine, prostaglandine, leucotrieni, proteasi etc per azione dei leucociti e dei macrofagi attivati si producono ROS, in particolare ONOO (perossinitrito), un radicale molto potente che induce la nitrosazione delle proteine. Inoltre, l'azione proossidante/attivante sui fattori di trascrizione nucleare (NF- $\kappa$ B, *factor kappa-B*,) e (AP-1, *activator protein-1*), responsabili dell'espressione di interleuchine chemiotattiche e proinfiammatorie della famiglia di interleuchina 8, è un meccanismo per alimentare e perpetuare il processo infiammatorio. Se il sistema antiossidante non è sufficiente a rimuovere l'eccesso di ROS, questi inducono danno ai lipidi, proteine e a macromolecole, quali DNA ed RNA e durante il processo infiammatorio cronico svolgono un ruolo causale nel determinare mutazioni nel DNA. Nel caso dell' 8 -oxo-2'-deoxyguanosina, che deriva dall'ossidazione dei residui della guanina nel DNA, se questa non viene rimossa da una specifica "glicosilasi", per perdita della sua attività glicosilasica, questa induce un aumento delle mutazioni spontanee associate ad attività mutagena. La lesione indotta da ROS può anche interessare oncogeni, come K-ras, che vengono attivati oppure geni soppressori, quali la P<sub>53</sub> che il danno inattiva. Due relazioni di detto Simposio

riguarderanno i microRNA; studi recenti infatti, riportano un 'associazione fra espressione dei microRNA, coinvolti nei meccanismi biologici che regolano la crescita e il differenziamento cellulare, e risposta allo stress ossidativo nella citotossicità di varie sostanze.

## **I Metalli nei Prodotti Cosmetici: dall'inevitabilità Tecnologica alla Sicurezza d'uso**

**Marina Marinovich**

*(Università degli Studi di Milano)*

Il nuovo regolamento sui prodotti cosmetici prevede che tracce di metalli siano tollerate purché tecnicamente inevitabili, ferma restando la sicurezza d'uso del prodotto stesso. Questo articolo sta creando non poche problematiche a livello dei produttori e delle autorità preposte al controllo, mancando direttive nazionali e comunitarie che stabiliscano i limiti di tollerabilità.

Il simposio si propone di discutere i vari punti critici connessi all'argomento e in particolare l'assenza di metodi ufficiali e convalidati per la speciazione dei metalli in matrici quali i prodotti cosmetici (è noto che per uno stesso metallo valenze diverse hanno effetti tossici molto diversi), la tossicità intrinseca dei metalli stessi (inclusi gli effetti allergici) e la possibilità di arrivare ad una valutazione caso per caso della sicurezza.

## **Particolato atmosferico: valutazione integrata di rischi e benefici**

**Emanuela Corsini**

*(Università degli Studi di Milano)*

La Comunità Europea prevede entro il 2020 una riduzione del 20% delle emissioni di gas a effetto serra; l'utilizzo di una quota del 20% di energie rinnovabili rispetto al totale dei consumi energetici; aumento dell'efficienza energetica per ottenere un risparmio del 20% dei consumi; utilizzo di una quota del 20% di biocarburanti sul globale del settore dei trasporti. Per raggiungere l'obiettivo della riduzione delle emissioni, i vari Paesi stanno intensificando gli sforzi per includere nei Piani energetici nazionali un aumento della quota percentuale delle energie rinnovabili

(solare, vento ecc.) e dell'efficienza energetica dei motori e degli apparecchi elettrici, assieme a misure di risparmio energetico e all'utilizzo di combustibili alternativi. L'incremento di utilizzo della biomassa per il riscaldamento domestico e per la produzione di energia elettrica è quindi una prospettiva concreta.

Gli effetti sulla salute della combustione della biomassa sono essenzialmente indiretti e dovuti al fatto che le tecnologie utilizzate per la combustione spesso non sono sufficientemente sicure rispetto alla protezione della salute; a causa dell'estesa scala spaziale di utilizzo, gli effetti si estendono sostanzialmente a tutte le popolazioni. Obiettivo generale del simposio è fornire una valutazione, completa per quanto possibile, dell'impatto della combustione domestica della legna sull'ambiente e degli effetti sulla salute umana generati dalla presenza di materiale particolato e di composti potenzialmente tossici nelle emissioni di impianti di combustione domestici, che utilizzano la legna come combustibile (stufe, caminetti, forni), e nell'aria ambiente, all'interno e all'esterno dei luoghi dove avviene la combustione.

## **Prodotti botanici come integratori alimentari: il punto sulla sicurezza**

**Marinella Trovato**  
(SISTE)

Si definiscono integratori alimentari i prodotti alimentari destinati ad integrare la dieta normale che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico.

Disciplinati a livello europeo con la direttiva 46/2002/CE, gli integratori alimentari possono contenere vitamine, minerali, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale.

All'interno di tali classi di sostanze il legislatore comunitario ha definito una lista positiva solo di vitamine e sali minerali, lasciando ampia libertà ai singoli stati di identificare quali, tra le altre classi di sostanze, ammettere o meno sui loro mercati.

La mancanza di linee direttrici ufficiali e armonizzate, su quali sostanze si possano o meno utilizzare negli integratori alimentari, crea difficoltà sul mercato ed è ragione di interventi da parte della Corte di giustizia europea.

Ferma restando la responsabilità delle singole imprese di immettere sul mercato solo prodotti

sicuri per il consumatore, i criteri per la valutazione della sicurezza dei singoli componenti di tali prodotti rappresentano una delle questioni più critiche soprattutto per quanto riguarda i vegetali ed i loro derivati. Se la sicurezza può essere fondata sull'uso tradizionale delle piante e dei loro derivati per talune categorie di farmaci, per quanto riguarda l'uso di piante e derivati negli integratori alimentari, la sicurezza deve rispondere a precisi criteri di scientificità così come evidenziato nelle specifiche linee guida Efsa.

Maggiore scientificità è richiesta anche per le attività fisiologiche degli integratori alimentari, specie se a base di piante e loro derivati, così come previsto dal regolamento 1924/06/CE, meglio conosciuto come regolamento claims.

In tema di integratori alimentari a base di piante le questioni irrisolte a livello europeo riguardano la lista delle piante di possibile utilizzo, la determinazione degli effetti di tali prodotti e la valutazione della loro sicurezza.

Di queste questioni e delle possibili soluzioni individuabili nel contesto del progetto di ricerca europeo PlantiLIBRA si parlerà in occasione del simposio "Prodotti botanici come integratori alimentari: il punto sulla sicurezza" che si svolgerà il prossimo 22 marzo nell'ambito del 16° Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia, a Giardini Naxos.

## **Tavola Rotonda: Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici e la sicurezza dei farmaci**

**Enzo Chiesara**  
(Università degli Studi di Milano)

Ci sono scosse di assestamento legislativo spesso più dannose delle vere scosse a sciami dei terremoti. Nascono per lo più da necessità di sostegno elettorale, smanie di notorietà, ma anche, se pur raramente, da vere necessità come accade per il Recepimento della Direttiva Europea 2010/63 sulla Protezione degli Animali.

La Tavola Rotonda vorrebbe far capire al mondo, politico e non, che quanto esprime in maniera ossessiva e ripetitiva "Noi puntiamo all'abolizione di questi metodi perché crediamo molto nella validità di test alternativi molto più accettabili dal punto di vista etico e altrettanto attendibili sul piano della risposta scientifica" (intervento

dell'on. Brambilla citato dal Corriere della Sera del 2 febbraio 2012 nell'articolo "La Camera approva la norma anti Green Hill") sia accettabile dal punto di vista della razionalità e quanto invece lo sia dal punto di vista dell'emotività elettorale. A conferma di tale emotività nello stesso articolo l'informazione utilizza termini terroristici e mette sullo stesso piano l'art. 16 approvato dalla Camera nel suo lavoro legislativo di Recepimento della Direttiva Europea 2010/63 e il pericolo, secondo gli Animalisti italiani, rappresentato dall'Emendamento a firma del deputato del Carroccio Gianluca Pini, respinto nella medesima votazione, che proponeva "l'apertura della caccia in piena estate di tortore e quaglie con gravissimi rischi per i villeggianti e l'allungamento della stagione fino al 31 gennaio".

A questo mira l'intervento sui Metodi Alternativi nel quale viene esposto l'oggettivo punto di vista del Mondo della Ricerca Scientifica, spontanea e regolatoria, sul concetto di Metodo alternativo e sulla giusta luce nella quale va visto un argomento che è da tutti auspicabile, compresi i vivisezionisti, se parliamo in termini medioevali, o gli sperimentatori con animali, se parliamo in termini attuali.

La Tavola Rotonda nasce dalla necessità di istituire un Tavolo di Lavoro cui dovrebbero partecipare tutte le Componenti coinvolte nella problematica della sperimentazione animale (Società Scientifiche, Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, Istituzioni di ricerca pubbliche e private, Farmindustria e Associazioni Protezionistiche) con lo scopo di fornire un supporto articolato al Parlamento nel suo compito legislativo di Recepimento della Direttiva Europea 2010/63.

Le integrazioni proposte fino ad oggi dalla Commissione, a nostro avviso, non determinano un sostanziale vantaggio per il benessere degli animali. Si tratta infatti di restrizioni più di tipo ideologico, relative a quale tipo di utilizzo sia ammissibile, e che mirano a ridurre il numero di animali allevati e utilizzati sul territorio nazionale, piuttosto che a migliorarne le condizioni nel corso della sperimentazione.

La sperimentazione animale è oggetto di una Direttiva Europea (2010/63) che andrà recepita dagli Stati membri nel gennaio del 2013 e armonizza il benessere degli animali (vedi Comitato per il benessere degli animali, Obbligo dell'analgesia negli esperimenti che possono arrecare dolore, sofferenza e angoscia negli animali ecc.) con la ineludibile necessità della sperimentazione stessa

ai fini di una maggior sicurezza della comunità come richiesto e spesso imposto da tutte le normative nazionali e sovranazionali.

Molta della ricerca biomedica che si svolge presso gli Enti di Ricerca, pubblici e privati, è basata su una corretta sperimentazione animale. I ricercatori sanno molto bene che il benessere degli animali è essenziale per ottenere risultati validi, riproducibili e non contaminati da situazioni patologiche o di stress che invaliderebbero i risultati sperimentali ottenuti. Quanto è rappresentato dai mezzi di comunicazione è ricordo di un remoto passato.

Va inoltre sottolineato che la sperimentazione animale è sempre soggetta al controllo di vari organismi quali Comitati Etici, Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità.

Questa Tavola Rotonda non si prefigge che la voce della ragione prevalga sulla voce dell'emotività (sarebbe impensabile), ma che almeno venga ascoltata.

## **Intossicazioni da monossido di carbonio: rischi, prevenzione e cura**

***Sono circa 400 ogni anno i casi di avvelenamento da monossido di carbonio gestiti dal Centro Nazionale di Informazione Tossicologica (CNIT) dell'IRCCS Fondazione Maugeri.***

***Comunicato stampa 18/01/2012, IRCCS Fondazione S. Maugeri, Pavia***

- Circa 400 all'anno le consulenze erogate dal CNIT di Fondazione Maugeri per intossicazioni da CO
- 32 anni l'età media dei soggetti trattati dal CNIT
- il 20% sono bambini sotto i 12 anni
- 

Nei periodi invernali, in particolare in caso di ondate di freddo eccezionale o in mancanza di mezzi adeguati di riscaldamento, aumenta la necessità di riscaldare gli ambienti e con essa il rischio di avvelenamento da monossido di carbonio (CO), un gas altamente tossico, inodore, incolore, insapore, non irritante e quasi impercettibile. Si tratta di un'intossicazione prettamente stagionale causata dalla "cattiva" combustione di carburanti contenenti carbonio che si genera all'interno di impianti di riscaldamento difettosi, installati scorrettamente, o quando vengono utilizzati dispositivi impropri, come i bracieri, o camini mal funzionanti, particolarmente pericolosi se si

concentrano in ambienti chiusi come le stanze di una abitazione, garage o cantine. L'intossicazione da monossido di carbonio è una delle cause più frequenti di avvelenamento accidentale nei paesi industrializzati; tra i soggetti più a rischio vi sono i bambini, le donne in gravidanza, gli anziani e i cardiopatici.

Presso il **Centro Nazionale di Informazione Tossicologica - Centro Antiveneni di Pavia dell'IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, tra il 2007 e il 2010, sono state erogate annualmente circa 400 consulenze per intossicazioni da CO.** I soggetti trattati hanno mediamente 32 anni e nel 20% dei casi si tratta di bambini sotto i 12 anni.

“Il monossido di carbonio - afferma la Dr.ssa Valeria Petrolini, **tossicologo del Centro Nazionale di Informazione Tossicologica-Centro Antiveneni dell'IRCCS Fondazione Maugeri** - si forma dalla combustione incompleta per carenza di ossigeno di composti organici come metano, carbone, legname. Le conseguenze di un'intossicazione da CO dipendono dalla durata di esposizione e dalla concentrazione del gas inalato e possono essere lievi (cefalea, nausea, vomito, stanchezza) o gravi (confusione mentale, perdita di coscienza, sopore, coma, convulsioni, ma anche dolore toracico o cardiopalmo). Concentrazioni elevate o esposizioni molto prolungate - continua la Dr.ssa Petrolini - possono essere letali; occorre fare molta attenzione ai sintomi, da non confondere con quelli di altre patologie, come intossicazione alimentare o sindrome influenzale: quando si manifestano disturbi di qualunque tipo in un ambiente dove sono presenti processi di combustione o quando

si manifestano sintomi in più persone nello stesso ambiente, è importante sospettare la presenza di monossido di carbonio, quindi aerare subito l'ambiente e chiamare i soccorsi. La terapia per gli intossicati è l'ossigenoterapia che, in molti casi, deve essere fatta in camera iperbarica”.

### Cause

- impianti e apparecchi riscaldanti inadeguati (es. bracieri) e mal funzionanti, vecchi o installati scorrettamente (caldaie murali e scaldacqua a fiamma libera, stufe e caminetti)
- processi di combustione in ambiente povero di ossigeno

### Cosa fare e non fare

- provvedere a una manutenzione regolare dell'impianto termico da parte di personale qualificato
- controllare periodicamente i requisiti di sicurezza dei dispositivi, non modificarli autonomamente
- verificare la pervietà e il tiraggio dei camini
- non otturare le prese d'aria e garantire un adeguato apporto di ossigeno nei locali
- non utilizzare bracieri e barbecue e generatori di corrente in ambienti chiusi

### In caso di sospetta intossicazione:

- allontanare l'eventuale intossicato all'ambiente contaminato e, se incosciente, posizionarlo sul fianco
- aerare i locali
- chiamare il 118

**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 XV n. 1 - Febbraio-Marzo 2012

Direttore Responsabile Patrizia Hrelia

Comitato Editoriale: Gioacchino Calapai, Maura Lodovici, Marco Pivato, Emanuela Testai, Aurelia Tubaro

Segreteria Editoriale: Ida Ceserani

CONSIGLIO DIRETTIVO

Presidente: Marina Marinovich

Presidente eletto: Carlo Locatelli

Consiglieri: Gioacchino Calapai, Corrado Galli, Patrizia Hrelia, Maura Lodovici, Emanuela Testai, Aurelia Tubaro

Segretario: Giuseppe Malinverno

Past President: Giorgio Cantelli Forti

Segreteria Organizzativa: Viale Abruzzi, 32- 20131 Milano - Tel 02-29520311- Fax 02-29520179 - E-mail: sitox@comm2000.it - Sito Internet: <http://www.sitox.org>

Impaginazione e stampa: RB stampa e grafica - Torino

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

Tariffa Associazioni senza Fini di Lucro: "Poste italiane S.p.A. - Spedizione in abbonamento Postale D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004 n 46) Art. 1, comma 2 e 3 CB-NO/TORINO - ANNO 2010 N 1

Abilitazione n CB-NO02 15/2010 del 02/02/2010