

## Indice:

Editoriale <i>S. Vecchio</i> .....	pag. 1
Lettera congiunta SIF-SINS-SITOX .....	pag. 3
Confronto tra formulazioni SOLide e LIquide di farmaci agonisti oppioidi nel trattamento del Disturbo da uso di Oppiacei (Studio SO.LI.D.O) <i>L. Somaini, C. Leonardi, S. De Fazio, S. Vecchio</i> .....	pag. 4
Effetto dell'oleuropeina sulla modulazione del microambiente pro-infiammatorio in tumori del colon-retto di un modello sperimentale <i>in vivo</i> <i>S. Chioccioli</i> .....	pag. 8
I recettori AMPA calcio permeabili come possibile target terapeutico nella neurotossicità da astinenza da etanolo: studi preclinici in fettine ippocampali di ratto <i>E. Gerace</i> .....	pag. 10
Valutazione <i>in vitro</i> degli effetti diretti del glifosato sui linfociti T helper <i>A. Maddalon</i> .....	pag. 12
Effetto protettivo di un estratto del succo di bergamotto ricco di flavonoidi, da solo o in associazione con curcumina e resveratrolo, in un modello murino di tossicità testicolare indotta da cadmio <i>L. Musumeci</i> .....	pag. 13
L'uso di un sistema 3D di epitelio intestinale umano per studiare il ruolo dei trasportatori nell'assorbimento intestinale delle microcistine <i>N. Santori, L. Turco, F. M. Buratti, E. Testai</i> .....	pag. 15
Sigarette elettroniche: un prezioso alleato o un insidioso nemico? <i>F. Vivarelli, D. Canistro</i> .....	pag. 18
Strategie innovative nella valutazione tossicologica delle sostanze chimiche <i>C. Rovida</i> .....	pag. 21

## Editoriale

*Sarah Vecchio*

Il numero di SITOX Informa del dicembre 2021 si chiudeva con l'augurio che la rivista potesse trasformarsi, in un'ottica di modernizzazione e attualità, per andare a rivestire il giusto ruolo all'interno dei nuovi strumenti comunicativi, informativi e formativi di SITOX. L'auspicio, grazie all'aiuto di tutti i colleghi del Consiglio Direttivo e del Comitato Editoriale, è diventato realtà e dalla prossima uscita SITOX Informa, così come lo abbiamo sempre conosciuto, si trasformerà e prenderà il nome di "Giornale Italiano di Tossicologia" o G.I.T. - organo ufficiale della Società Italiana di Tossicologia. Sentivamo l'esigenza di avere uno spazio di comunicazione e scambio di informazioni con un target chiaramente identificato nei professionisti che operano nel vasto mondo della tossicologia in tutte le sue sfaccettature, lasciando a sito, social e blog aspetti più informativi e divulgativi e pur mantenendo a tutti i livelli l'elevata scientificità e onestà intellettuale che contraddistinguono la Società.

Per questo "ultimo" numero della rivista abbiamo dato spazio a contributi che rispecchiano alcuni degli obiettivi che sono all'ordine del giorno della Società e che troveranno ampio spazio di discussione anche nel G.I.T. Ospitiamo infatti la lettera congiunta SIF (Società Italiana di Farmacologia) - SITOX - SINS (Società Italiana di Neuroscienze) relativa alla proroga al 1° luglio 2025 dell'applicazione del divieto che impedisce ai ricercatori italiani di impiegare animali nella sperimentazione che riguarda lo studio delle proprietà d'abuso

dei farmaci. Il confronto e la collaborazione tra società scientifiche che condividono spazi di interesse si conferma per SITOX uno strumento fondamentale di crescita e arricchimento, e imprescindibile per lo sviluppo di progetti di interesse comune.

Il secondo articolo tocca invece il tema della tossicologia delle dipendenze e del Disturbo da Uso di Sostanze, ambito nel quale ricerca e pratica clinica si fondono quotidianamente con l'ambizione di garantire livelli di assistenza e di trattamento ottimali per i pazienti affetti da tale patologia. Il settore delle dipendenze trova ancora oggi troppo poco riconoscimento in ambito organizzativo e di programmazione a vari livelli e paga lo scotto di uno stigma che continua a colpire non solo le persone che ne sono affette, ma anche i professionisti che se ne occupano. Uno degli obiettivi di SITOX è quello di collaborare attivamente nella crescita e nell'affermazione professionale dei tossicologi clinici e non solo che studiano, fanno ricerca e operano tutti i giorni a fianco dei cittadini portatori di tale problematica, oltre a sostenere la necessità di identificare un percorso formativo ad oggi non chiaramente definito che prepari in modo adeguato alla gestione della patologia da dipendenza.

I contributi successivi sono una testimonianza dell'impegno che SITOX investe sui giovani tossicologi e sono stati infatti preparati dai colleghi vincitori dei premi per le migliori comunicazioni orali e i migliori poster presentati nell'ambito del 20° Congresso Nazionale SITOX, tenutosi nell'ottobre 2021 a Bologna. Emerge tra l'altro, se ancora ce ne fosse bisogno, l'eterogeneità degli interessi di ricerca che da sempre contraddistingue SITOX e la realtà della tossicologia italiana, valore aggiunto che la Società porta avanti in ogni ambito di azione. I colleghi autori dei contributi hanno risposto con entusiasmo alla richiesta di condividere qui il loro lavoro, e tutti ci

auguriamo che il G.I.T. possa ancora di più rappresentare uno spazio e una vetrina per il lavoro di tanti giovani ricercatori e professionisti.

Chiude poi il numero l'interessante contributo di una collega del Comitato Editoriale che presenta il cluster ASPIS dei progetti europei RiskHunt3R, Precision Tox e Ontox, creati nell'ambito del progetto quadro Horizon 2020 della Commissione Europea e dedicati alla valutazione delle sostanze chimiche con metodi innovativi e *human relevant*.

Nel salutare SITOX Informa, colgo l'occasione per ringraziare quanti in questi anni hanno contribuito a portare avanti questo importante strumento comunicativo della Società e per invitare tutti i soci ad essere parte attiva nella crescita del G.I.T. A questo proposito, anticipo che gli obiettivi sono di mantenere una costante pubblicazione quadrimestrale, identificare norme editoriali che si discostino poco dalle attuali di SITOX Informa, per lasciare ovviamente e convintamente spazio a contributi di ogni "estrazione" tossicologica e coinvolgere ogni membro della Società che abbia il piacere di condividere con il mondo SITOX il proprio lavoro. Altra novità in cantiere è inoltre la preparazione di podcast quali strumento di immediata fruizione, legati all'uscita del G.I.T. e che ne riprendano i temi trattati, ma non solo, in modo che le voci e l'*expertise* dei soci SITOX possano raggiungere quanti più operatori e studiosi possibili.

A presto quindi, sul G.I.T. e *on air*.

## Lettera Congiunta SIF-SINS-SITOX Sperimentazione animale e proprietà d'abuso dei farmaci

Le Società Italiane di Farmacologia (SIF), di Tossicologia (SITOX) e di Neuroscienze (SINS) esprimono piena soddisfazione per le decisioni delle Commissioni Affari costituzionali e Bilancio della Camera e quindi del Parlamento che hanno prorogato al 1° luglio 2025 l'applicazione del divieto che impedisce ai ricercatori italiani di impiegare animali nella sperimentazione che riguarda lo studio delle proprietà d'abuso dei farmaci, divieto che rappresenta un *unicum* legislativo italiano non riscontrabile negli altri paesi membri della UE. Infatti, l'applicazione di questo divieto si pone in contrasto con l'attuale normativa europea che regola l'utilizzo di animali a fini scientifici, ed ha portato all'apertura di una procedura di infrazione contro l'Italia (n.2016/2013).

L'utilizzo di animali per la sperimentazione volta a studiare le proprietà d'abuso dei farmaci è un argomento dibattuto nell'opinione pubblica, poiché numerosi movimenti contrari alla sperimentazione animale etichettano tale pratica con termini come "*inutile*" ed "*egoistica*", dal momento che, a loro dire, questo tipo di ricerca avrebbe lo scopo esclusivo di studiare un "*vizio*" prettamente umano, ossia la dipendenza. Tale affermazione è facilmente contestabile, in quanto si basa su una concezione ideologica del problema, che non tiene conto delle basi neurobiologiche del fenomeno della dipendenza patologica. Infatti, numerose evidenze sperimentali dimostrano che non solo la dipendenza patologica è un fenomeno che si può manifestare anche negli animali, ma che le basi neurobiologiche di questo fenomeno sono sovrapponibili tra uomo ed animali. Pertanto, la ricerca sulle proprietà d'abuso dei farmaci possiede indubbio valore scientifico, dal momento che consente di studiare e sviluppare nuove terapie per pazienti sofferenti di dipendenze da sostan-

ze, lecite e illecite, e di dipendenze di tipo non farmacologico, e sono tutte riconosciute come disturbi psichiatrici dal Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-V). Le dipendenze patologiche quindi necessitano di adeguati trattamenti, al pari di altre patologie che interessano il cervello, e non possono essere derubricate semplicemente a "*vizio tipicamente umano*". Inoltre, la ricerca sulle proprietà d'abuso dei farmaci non riguarda esclusivamente le sostanze che vengono definite volgarmente "*droghe*", ma la sua effettuazione è richiesta per legge per consentire l'approvazione e l'immissione in commercio di nuovi farmaci, che agiscono a livello del sistema nervoso centrale. La comunità scientifica è conscia delle problematiche associate alla sperimentazione animale e promuove lo sviluppo di validi metodi alternativi che al momento non sono ancora sufficienti a sostituirla completamente. L'applicazione definitiva del divieto di utilizzo di animali per le ricerche sui farmaci d'abuso avrebbe effetti devastanti, non solo per le persone che soffrono di dipendenze, ma anche per tutti coloro che soffrono di altre patologie neurologiche e psichiatriche, che vedrebbero quindi annullata la possibilità di ricevere nuove terapie più efficaci, dal momento che lo sviluppo delle stesse subirebbe un'interruzione, venendo a mancare la ricerca di tipo preclinico in questo ambito.

Per questi motivi le società scientifiche SIF, SINS e SITOX hanno accolto con estremo favore la scelta del nostro Parlamento che ha compreso l'importanza di questa problematica rimandando al 1° luglio 2025 l'applicazione del divieto che impedisce ai ricercatori italiani di impiegare animali nella sperimentazione che riguarda lo studio delle proprietà d'abuso dei farmaci, e ringraziano sentitamente tutti i Parlamentari che hanno contribuito all'approvazione di questa decisione. Questa decisione contribuisce a difendere il valore della ricerca biomedica e della scienza in Italia contro una deriva anti-scientifica che sta avendo ed avrà in futuro,

se non arginata, effetti deleteri non solo sulla salute pubblica, ma anche sullo sviluppo e sulla competitività del Paese.

### **Confronto tra formulazioni SOLIDE e LIQUIDE di farmaci agonisti oppioidi nel trattamento del Disturbo da uso di Oppiacei (Studio SO.LI.D.O)**

**Lorenzo Somaini<sup>1</sup>, Claudio Leonardi<sup>2</sup>, Salvatore De Fazio<sup>3</sup>, Sarah Vecchio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>SERD ASL Biella, Biella, <sup>2</sup>Claudio Leonardi, SERD ASL Roma2, Roma, <sup>3</sup>SERD ASL Brindisi, Brindisi

#### **Premesse**

Il Disturbo da Uso di Oppiacei (DUO) è considerata una malattia cronica del cervello ad andamento recidivante, che coinvolge interazioni complesse tra circuiti cerebrali della ricompensa, della motivazione e della memoria, le quali conducono a caratteristiche manifestazioni biologiche, psicologiche e sociali [1]. Nell'Unione Europea la prevalenza di utilizzatori di oppiacei ad alto rischio tra gli adulti (15-64 anni) è stimata essere pari allo 0,4%, l'equivalente di circa 1,3 milioni di consumatori di oppiacei ad alto rischio. In tale popolazione l'eroina rimane l'oppioide più comunemente utilizzato in Europa e oppiacei sono stati rilevati nel 76% degli 5679 decessi per overdose che hanno coinvolto almeno una droga illecita nell'Unione europea (incluse Norvegia e Turchia) nella fascia di età compresa tra i 15 e 64 anni nel 2019, con un tasso di mortalità del 14.8 per milione di abitanti [2].

Il trattamento del DUO prevede un approccio multidisciplinare che abbina al trattamento farmacologico un insieme di interventi psico-socio-riabilitativi [3]. Numerose opzioni terapeutiche sono ad oggi disponibili: tali opzioni possono essere suddivise in trattamenti "daily based" e trattamenti "extended release". Tra i primi,

quelli maggiormente diffusi in Europa sono rappresentati dalle formulazioni liquide di metadone sia in forma racemica (metadone) che levogira (levometadone), seguite poi da formulazioni in compresse e in film sublinguali di buprenorfina e della combinazione buprenorfina-naloxone, e in ultimo dalla morfina orale a lento rilascio (SROM). Recentemente sono state approvate in diversi paesi nuove formulazioni "extended release" di buprenorfina, con possibilità di somministrazioni settimanali e mensili [4].

Le condizioni di accesso alla terapia con metadone e le modalità di gestione del trattamento variano nei vari paesi [5], ma in genere il trattamento di mantenimento con metadone richiede un attento monitoraggio a causa delle proprietà farmacodinamiche della molecola. Superata la fase di induzione, il farmaco viene generalmente assunto dal paziente sotto supervisione degli operatori del SerD (Servizio per le Dipendenze) almeno una volta alla settimana o ogni 15 giorni per verificare la tolleranza al farmaco, mentre la quantità di farmaco per i restanti giorni viene affidata per l'assunzione al domicilio (dosi *take-home*). Nel complesso, l'uso delle diverse formulazioni di metadone ha dimostrato un impatto positivo nel ridurre i danni correlati al DUO, i decessi correlati con il consumo di oppiacei e nel limitare la diffusione dei *bloodborne virus* (BBV), in assenza di un impatto negativo sulla quotidianità dei pazienti [1].

In diversi paesi europei come Francia, Spagna, Paesi Bassi e Germania, accanto alle formulazioni liquide, sono state rese disponibili formulazioni solide (compresse, capsule) di metadone con un range di dosaggi tra i 5 e i 60 mg. Laddove introdotte, se confrontate con quelle liquide, tali formulazioni hanno evidenziato una serie di vantaggi sia per i pazienti che per l'organizzazione del sistema di cura ed in particolare:

- un miglioramento dell'accettabilità del trattamento farmacologico, in quanto le compresse sono meno stigmatizzanti rispetto alle formulazioni liquide;
- la riduzione di alcuni degli effetti collaterali dello sciroppo, come nausea e vomito [6], e degli effetti collaterali derivanti dal consumo quotidiano di zucchero;
- la semplificazione della logistica delle dosi *take-home*, con miglioramento della gestione a livello domestico del farmaco e durante gli spostamenti del paziente per le esigenze di vita quotidiana;
- la semplificazione, all'interno degli ambulatori di dispensazione dei farmaci presso i SerD, della preparazione della quantità di farmaco per i pazienti con regime di affido domiciliare della terapia.

### Scopo dello studio

Lo scopo del presente progetto pilota, denominato Studio SO.LI.D.O., è quello di indagare il possibile impatto organizzativo ed economico dell'introduzione di una nuova formulazione in compresse di metadone nella gestione dei pazienti affetti da DUO all'interno dei Servizi per le Dipendenze italiani. Il presente progetto pilota ha coinvolto tre SerD suddivisi per area geografica in Nord Italia (SerD ASL BIELLA), Centro Italia (SerD ASL Roma 2) e Sud Italia (SerD ASL Brindisi).

### Metodi

Nei tre centri partecipanti sono state valutate le differenze in termini di costi (materiale necessario per la preparazione delle dosi *take-home*) e di tempo necessario alla preparazione e alla dispensazione di una formulazione in compresse (solida) vs quella in sciroppo (liquida) di metadone. Come formulazione solida, non essendo ancora disponibile nel mercato italiano la formulazione in compresse di metadone,

sono state utilizzate le compresse sublinguali di buprenorfina che per formulazione e gestione ambulatoriale più si avvicinano alla specialità medicinale oggetto del presente studio. I dosaggi dei due farmaci considerati (metadone sciroppo e buprenorfina compresse sublinguali) corrispondono ai dosaggi medi utilizzati nei SerD italiani [7].

Lo studio è stato condotto mediante l'analisi di due scenari:

- scenario A, che prevede un regime di affido domiciliare di 6 giorni (assunzione della dose giornaliera del farmaco presso il SerD e 6 giorni di affido domiciliare). In tale scenario sono stati confrontati 30 pazienti (10 per ogni centro) in trattamento con metadone sciroppo al dosaggio di 60 mg/die e 30 pazienti in trattamento con buprenorfina compresse sublinguali al dosaggio 8 mg/die;
- scenario B, che prevede un regime di affido domiciliare di 13 giorni (assunzione della dose giornaliera del farmaco presso il SerD e 13 giorni di affido domiciliare). In tale scenario sono stati confrontati 30 pazienti (10 per ogni centro) in trattamento con metadone sciroppo al dosaggio di 60 mg/die e 30 pazienti in trattamento con buprenorfina compresse sublinguali al dosaggio 8 mg/die.

La valutazione economica all'interno dei due diversi scenari ha riguardato i tempi medi impiegati da parte degli infermieri per la preparazione e la dispensazione del farmaco, i tempi medi per il calcolo della giacenza e la chiusura della giornata di lavoro sul sistema di erogazione automatizzata dei farmaci, e i costi del materiale necessario per la preparazione dell'affido (flacone di plastica da 25 ml e relativo tappo, necessari solo per la formulazione liquida).

I tempi sono stati calcolati da due infermieri per centro partecipante: un infermiere ha cronometrato il collega durante lo svolgimento delle azioni prese in esame dallo

studio nella quotidiana attività ambulatoriale.

I tempi ed i costi rilevati sono stati rapportati ad un numero di 100 ipotetici pazienti al fine di poter percentualizzare il risultato ottenuto in termini di differenza percentuale in tempo (minuti/ore) ed in costo di esercizio

### Risultati

Nelle tabelle 1 e 2 sono riportati i dati relativi all'analisi dei tempi necessari per la preparazione e la dispensazione dei diversi farmaci nei due scenari oggetto dello studio.

Tabella 1. Tempo operatore scenario A.

	Metadone 60 mg/die	Buprenorfina 8 mg/die
<b>Formulazione</b>	Sciroppo	Compresse Sublinguali
<b>Regime di affido</b>	6 giorni	6 giorni
<b>Tempi di preparazione e dispensazione (minuti X somministrazione)</b>	4	1,5
<b>Calcolo giacenza e apertura e chiusura giornata di lavoro (minuti X giorno di lavoro)</b>	40	40

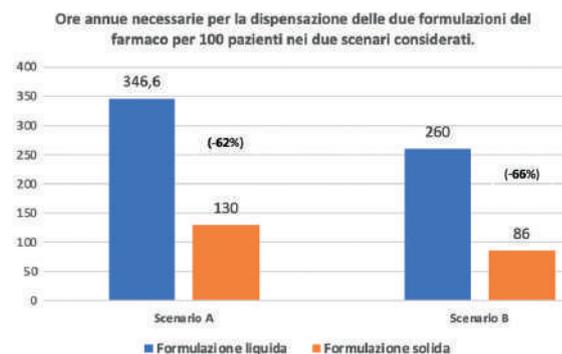
Se rapportati a 100 ipotetici pazienti, dalla rilevazione dei tempi nello scenario A si evince che per poter affidare 6 giorni di una formulazione in sciroppo sono necessari 400 minuti ogni 7 giorni, equivalenti a 346,6 ore/anno operatore. Diversamente, nel caso di utilizzo delle compresse il tempo necessario ammonta a 130 ore/anno operatore con un risparmio in termini di ore/anno pari al 62% (Figura 1).

Tabella 2. Tempo operatore scenario B.

	Metadone 60 mg/die	Buprenorfina 8 mg/die
<b>Formulazione</b>	Sciroppo	Compresse Sublinguali
<b>Regime di affido</b>	13 giorni	13 giorni
<b>Tempi di preparazione e dispensazione (minuti X somministrazione)</b>	6	2
<b>Calcolo giacenza e apertura e chiusura giornata di lavoro (minuti X giorno di lavoro)</b>	40	40

Se rapportati a 100 ipotetici pazienti, dalla rilevazione dei tempi nello scenario B si evidenzia che per poter affidare 13 giorni di una formulazione in sciroppo sono necessari 600 minuti ogni 14 giorni, equivalenti a 260 ore/anno operatore. Diversamente, nel caso di utilizzo delle compresse il tempo necessario ammonterebbe a 86 ore/anno operatore con un risparmio in termini di ore/anno pari al 66% (Figura 1).

Figura 1. Decremento % delle ore annue necessarie per la dispensazione della formulazione liquida vs quella solida riferito a 100 pazienti.



Nella tabella 3 sono riportati il costo unitario del flaconcino e del relativo tappo e la quantità annua necessaria per la preparazione e la dispensazione della formulazione in sciroppo di metadone secondo i diversi scenari.

Tabella 3. Costo e quantità del materiale suddivisi per scenario A e B.

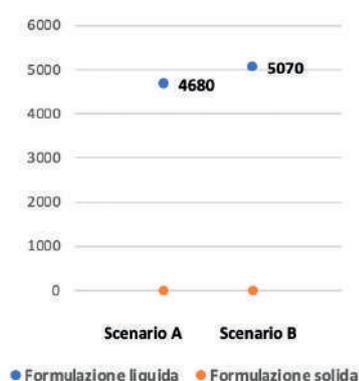
	Metadone 60 mg/die	Metadone 60 mg/die
<b>Formulazione</b>	Sciroppo	Sciroppo
<b>Scenario</b>	A	B
<b>Costo unitario flaconcino da 25 ml e relativo tappo (euro)</b>	0,15	0,15
<b>Numero di flaconcini/anno</b>	31200	33800

Nella Figura 2 sono riportati i costi totali diretti necessari per la preparazione e la dispensazione della formulazione in sciroppo di metadone secondo i diversi scenari. Come si nota dalla figura tali costi

non risultano essere applicabili ai pazienti in trattamento con la formulazione solida e pertanto rappresentano un risparmio diretto in termini di costi di esercizio.

Figura 2. Costo annuo totale di materiale riferito a 100 pazienti suddiviso per scenario A e B.

Costo annuo (Euro) dei flaconcini necessari per la dispensazione della terapia take home a 100 pazienti nei due scenari considerati.



## Discussione

Nel panorama italiano i trattamenti per il DUO sono rappresentati per circa il 70% da formulazioni liquide di metadone e levometadone e per il restante 30% da compresse sublinguali contenenti buprenorfina e l'associazione buprenorfina/naloxone. Nei prossimi mesi, analogamente a quanto avviene in altri paesi europei, anche in Italia saranno commercializzate formulazioni solide di metadone e di levometadone, che si andranno quindi ad affiancare alle formulazioni liquide già disponibili.

All'interno dei SerD una rilevante attività clinica è rappresentata dalla somministrazione e dalla erogazione di tali trattamenti con diversi regimi di affido domiciliare del farmaco, i quali possono variare da pochi giorni fino ad un massimo di 30 giorni. Generalmente i trattamenti a base di metadone sciroppo vengono erogati ai pazienti con modalità di affido domiciliare che prevede la preparazione di un singolo flaconcino di metadone predosato dall'infermiere per ogni giorno

di affido domiciliare previsto dal regime di trattamento. Tale procedura è in grado di ridurre al minimo il rischio di sovra o sotto dosaggio da parte del paziente. L'attività di preparazione dell'affido richiede un tempo variabile in funzione della posologia giornaliera e del numero di giorni previsto dal regime di affido.

I risultati del presente progetto pilota, seppur preliminari e condotti su un campione non rappresentativo di SerD italiani, hanno evidenziato una serie di possibili vantaggi che formulazioni in compresse di metadone potrebbero portare in termini di organizzazione dei servizi e di costi di esercizio. Dal confronto del tempo impiegato e rapportato a 100 ipotetici pazienti emerge come vi sia un risparmio di tempo/operatore pari al 62% su base annua (130 ore/anno vs 346,6 ore/anno) per regimi di affido di 6 giorni e del 66% (86 ore/anno vs 260 ore/anno) per regimi di affido di 13 giorni, il tutto a parità di posologia dal momento che saranno disponibili compresse di metadone da 60 mg/die, pari al dosaggio utilizzato nello studio. Anche se tali risparmi in termini di ore rappresentano solo risparmi di costi indiretti, queste ore potranno essere utilizzate per lo svolgimento di altre attività all'interno dei servizi.

Inoltre, se si analizzano i costi diretti, vale a dire i costi relativi al materiale necessario per la consegna del metadone a parità di altri costi standard del regime di affido domiciliare (costo del canone del sistema informatico e di erogazione automatica del metadone sciroppo), il passaggio di 100 pazienti ad un trattamento con metadone compresse porterebbe, assumendo un uguale costo per mg tra le due formulazioni, ad un risparmio annuo rispettivamente di 4.680 euro nel caso dello scenario A e di 5.070 nel caso dello scenario B. A tali risparmi andranno aggiunti quelli derivanti dalla minore produzione di rifiuti speciali legati anche allo smaltimento dei flaconi da

litro di metadone che vengono utilizzati negli erogatori automatici presenti all'interno dei SerD e non ancora quantificati nello studio pilota.

Nei prossimi mesi verrà condotto uno studio più esteso, che coinvolgerà un maggior numero di centri distribuiti sul territorio italiano, al fine di verificare e ampliare i risultati ottenuti nel corso del progetto pilota descritto.

### Conclusioni

Il trattamento del DUO con farmaci agonisti ha un ruolo noto e riconosciuto dalla comunità scientifica internazionale nella riduzione dei danni correlati alla patologia, del numero dei decessi associati al consumo di oppiacei e nella limitazione della diffusione di patologie infettive, oltre a favorire l'astensione dall'uso di sostanze nell'ambito di un approccio psico-socio-riabilitativo multidisciplinare. A fronte dell'assenza di nuove molecole in fase di studio, anche grazie all'elevata efficacia di quelle già disponibili (metadone, levometadone e buprenorfina), la ricerca è orientata all'identificazione di nuove formulazioni in grado di favorire la *compliance* del paziente, migliorare le possibilità di monitoraggio dell'aderenza terapeutica da parte dei medici prescrittori e ridurre lo stigma a cui ancora oggi le persone affette da DUO sono soggette.

L'introduzione sul mercato italiano delle compresse di metadone e levometadone potrà ampliare il bagaglio terapeutico a disposizione dei professionisti operanti nei SerD, con una ricaduta positiva in termini di costi diretti e indiretti di gestione e maggiori possibilità di andare incontro ai bisogni di pazienti che necessitano una terapia cronica, la quale deve impattare il meno possibile sulla quotidianità riducendo allo stesso tempo lo stigma associato al DUO e al suo trattamento.

### Bibliografia

1. AA.VV. (2020): *The Asam National Practice Guideline for the Treatment of Opioid Use Disorder: 2020 Focused Update*. *J Addict Med.* 14(2S Suppl 1): 1-91.
2. *European Drug Report 2021: Trends and Development*. EMCCDA 2021
3. Dematteis M., Auriacombe M., D'agnone O., Somaini L., Szerman N., Littlewood R., Alam F., Alho H., Benyamina A., Bobes J., Daulouede J. P., Leonardi C., Maremmanni I., Torrens M., Walcher S., Soyka M. (2017): *Recommendations for Buprenorphine and Methadone Therapy in Opioid Use Disorder: A European Consensus*. *Expert Opin Pharmacother.* 18(18): 1987-1999.
4. Soyka M, Franke AG. *Recent advances in the treatment of opioid use disorders-focus on long-acting buprenorphine formulations*. *World J Psychiatry.* 2021 Sep 19;11(9):543-552. doi: 10.5498/wjpv.11.i9.543. PMID: 34631459; PMCID: PMC8474991.
5. Jin H., Marshall B. D. L., Degenhardt L., Strang J., Hickman M., Fiellin D. A., Ali R., Bruneau J., Larney S. (2020): *Global Opioid Agonist Treatment: A Review of Clinical Practices by Country*. *Addiction.* 115(12): 2243-2254.
6. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/TSO\\_court.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/TSO_court.pdf)
7. *Progetto STAR: Strengthening treatment access and retention for heroin addiction in Italian Drug Addiction Center*. Federserd 2013.

### Effetto dell'oleuropeina sulla modulazione del microambiente pro-infiammatorio in tumori del colon-retto di un modello sperimentale *in vivo*

Sofia Chioccioli

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

Vincitrice Borsa di Studio SITOX-Farmindustria per migliore Comunicazione Orale Sessione "Prof. Rodolfo Paoletti", 20° Congresso Nazionale della SITOX

Il cancro del colon retto (CRC) rappresenta la terza causa di morte per cancro a livello mondiale. Lo sviluppo di questa patologia viene tradizionalmente descritto come il susseguirsi temporale di mutazioni su geni

che svolgono differenti regolazioni cellulari la cui alterazione comporta a livello istologico l'evoluzione dell'epitelio normale in uno tumorale. Tale processo viene convenzionalmente denominato asse adenoma-carcinoma dove la mutazione a carico del gene oncosoppressore *Apc* (*Adenomatous polyposis coli*) rappresenta uno dei primi eventi caratterizzanti l'intero processo di cancerogenesi intestinale e viene riscontrata in circa il 70% dei casi di CRC.

Accanto alle alterazioni genetiche, l'insorgenza e lo sviluppo del CRC sono correlati a uno stato infiammatorio persistente nell'ospite. Infatti, è stato osservato come malattie croniche intestinali tra cui la malattia di Crohn e la colite ulcerosa siano associate a un maggior rischio di sviluppare tumori intestinali.

Sostanze di origine naturale, tra cui i derivati delle piante di olivo (*Olea europaea* L.), sono da tempo descritte come capaci di trattare differenti patologie umane. Studi *in vitro* hanno infatti dimostrato come queste, grazie soprattutto al loro contenuto in polifenoli, tra cui l'oleuropeina è particolarmente abbondante, siano in grado di esplicare molteplici attività inclusa quella antiossidante, antiinfiammatoria, cardio- e neuro-protettiva e anti-tumorale. Al contrario, sono limitati gli studi svolti *in vivo*, in particolare in modelli animali di cancerogenesi intestinale.

Date queste premesse, lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare se un estratto fogliare di olivo arricchito in oleuropeina (ORLE) fosse in grado di esplicare un'azione antinfiammatoria e alterare alcune caratteristiche di tumori del colon presenti nel ratto Pirc (*Polyposis in the rat colon*), un modello genetico di cancerogenesi intestinale. Questo modello è caratterizzato da una mutazione germinale nel gene oncosoppressore *Apc*, uno dei geni chiave del processo di cancerogenesi intestinale mu-

tato nella poliposi adenomatosa familiare (FAP) e nel cancro del colon sporadico.

Una volta stabilita *in vitro* la non tossicità dell'estratto ORLE nella linea cellulare di carcinoma coloretale HCT-116 e la sua capacità di ridurre l'espressione proteica di *iNOS* (nitrossido sintasi inducibile, marker di infiammazione) abbiamo intrapreso lo studio *in vivo* nel ratto Pirc. Gli animali di circa un anno di età, quindi con tumori già sviluppatasi nel colon, sono stati suddivisi in due gruppi: uno alimentato con la dieta in polvere AIN76 standard per roditori (gruppo di controllo, CTR), l'altro con la stessa dieta addizionata con l'ORLE a una concentrazione di 2.7 g/kg nella dieta, corrispondente all'incirca ad una dose di oleuropeina di 100 mg/Kg corporeo (gruppo ORLE). Per entrambi i gruppi il trattamento è stato seguito per una settimana, al termine del quale gli animali sono stati sacrificati ed eseguite le analisi su tumori, mucosa normale e macrofagi peritoneali.

I tumori colici dei ratti Pirc trattati con ORLE presentavano una ridotta attività proliferativa (espressione dell'antigene PCNA) e un maggior numero di eventi apoptotici rispetto a quelli presenti nelle lesioni di ratti Pirc di controllo. Inoltre, l'analisi di espressione genica valutata sui campioni di mucosa colica normale e tumorale mediante rapporto relativo dell'espressione di *iNOS*, rispetto all'*housekeeping*  $\beta$ -actina, ha rilevato un aumento significativo dell'espressione nei tumori del gruppo di CTR rispetto alla mucosa normale, a sottolineare la stretta correlazione tra infiammazione e cancro. Al contrario, nei tumori dei ratti trattati con ORLE l'over-espressione di *iNOS* rispetto alla mucosa normale era molto meno marcata, nonostante non sussistessero significative differenze a carico della quantità di infiltrato macrofagico associato alla mucosa tumorale (espressione del marker CD-68). Inoltre, esperimenti eseguiti su macrofagi peritoneali isolati da questi ratti hanno di-

mostrato che la produzione di NO da parte di queste cellule isolate da animali trattati con ORLE era significativamente ridotta rispetto a quella di macrofagi isolati da ratti del gruppo CTR.

Questi dati *in vivo* suggeriscono che ORLE sia in grado di interferire con alcuni degli *hallmarks* dei tumori, aspetto che è stato anche confermato dagli studi effettuati *in vitro*. Infatti, è stato osservato che ORLE (alla concentrazione di 50  $\mu$ M) è in grado di inibire il fenotipo pro-infiammatorio di macrofagi murini RAW264.7 attivati da lipopolisaccaride (LPS). Il trattamento con ORLE era inoltre in grado, di ridurre l'espressione genica di citochine infiammatorie come IL-6, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ , ma anche di inibire l'espressione proteica della ciclo-ossigenasi-2 (COX-2), della iNOS e la produzione di ossido nitrico.

Pertanto, questi dati documentano la capacità di ORLE di regolare negativamente la componente infiammatoria associata a tumori del colon; inoltre, gli effetti positivi osservati su proliferazione e apoptosi nei tumori fanno ipotizzare un possibile utilizzo di estratti arricchiti con oleuropeina, facilmente reperibili e non tossici per gli animali, anche in modelli di prevenzione del CRC.

Inoltre, poiché l'ORLE impiegata nello studio è stata ottenuta mediante una piattaforma industriale e sostenibile basata sull'utilizzo di prodotti di scarto derivati dalla produzione di olio, l'estratto non solo può rappresentare una possibile fonte nutraceutica sfruttabile da un punto di vista farmacologico, ma anche conveniente sotto il piano economico/ambientale rientrando nel principio "zero waste concept".

*Il lavoro è stato fatto in collaborazione con Ruzzolini, J.; Monaco, N.; Peppicelli, S.; Andreucci, E.; Urciuoli, S.; Romani, A.; Luceri, C.; Tortora, K.; Calorini, L.; Caderni, G.; Nediani, C.; Bianchini, F. afferenti a:*

- Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Università degli Studi di Firenze

- Dipartimento di NEUROFARBA Neuroscienze, Psicolo-

gia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Università degli Studi di Firenze

- PHYTOLAB (Pharmaceutical, Cosmetic, Food Supplement Technology and Analysis)

- DiSIA, Dipartimento di Statistica, Informatica, Applicazioni "Giuseppe Parenti", Università degli Studi di Firenze

- Centro di Eccellenza per la Ricerca, Trasferimento e Alta Formazione DenoTHE, Scuola di Medicina, Università degli Studi di Firenze

*I dati presentati sono stati pubblicati sulla rivista Antioxidants:*

*Oleuropein-Rich Leaf Extract as a Broad Inhibitor of Tumour and Macrophage iNOS in an Apc Mutant Rat Model. 2021, 10, 1577. <https://doi.org/10.3390/antiox10101577>*

## **I recettori AMPA calcio permeabili come possibile target terapeutico nella neurotossicità da astinenza da etanolo: studi preclinici in fette ipocampali di ratto**

**Elisabetta Gerace**

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

*Vincitrice Borsa di Studio SITOX-Farminindustria per migliore Comunicazione Orale Sessione "Prof. Paolo Preziosi", 20° Congresso Nazionale della SITOX*

L'alcolismo è una malattia cronica, recidivante e potenzialmente letale responsabile del 5,1% del carico globale di malattie. L'ultimo report stilato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) riporta che nel mondo ci sono circa 208 milioni di alcolisti e che il consumo di alcol contribuisce a 3 milioni di morti ogni anno e a circa 76.3 milioni di persone affette da disturbi legati all'uso dell'alcol (AUD) (*Global Status Report 2018*, WHO). Nonostante questo, attualmente non è presente una terapia univoca e realmente efficace per i disturbi da abuso di etanolo. Generalmente la pratica clinica prevede

l'uso combinato di trattamenti farmacologici e psicologici che sono volti a ottenere una piena riabilitazione psico-sociale del soggetto e a prevenire le eventuali ricadute. Sebbene i farmaci utilizzati per la terapia da AUD siano numerosi, il loro effetto complessivo è mirato alla disintossicazione, alla sedazione, alla riduzione delle recidive e soprattutto alla riduzione degli effetti piacevoli dell'alcol. Pertanto, nuovi e più specifici farmaci per i disturbi da uso di alcol sono un'esigenza clinica. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare i meccanismi molecolari indotti dall'etanolo, col fine ultimo di trovare uno specifico target in grado di essere utilizzato per lo sviluppo di nuovi farmaci per la terapia dell'AUD. In particolare, lo studio è stato svolto in un modello preclinico di fettine organotipiche ippocampali di ratto esposte cronicamente ad etanolo per una settimana e poi a 24 ore di astinenza, per mimare *in vitro* quello che accade *in vivo* nell'animale e nell'uomo. In queste condizioni sperimentali abbiamo osservato che l'astinenza da etanolo induce una morte cellulare selettiva in una regione specifica dell'ippocampo chiamata CA1 e che questa morte è mediata dai recettori del glutammato AMPA (Gerace *et al.*, 2019). I recettori AMPA (AMPA) sono recettori canale del glutammato che mediano la neurotrasmissione sinaptica eccitatoria veloce e sono strutturalmente composti da quattro subunità (GluA1, GluA2, GluA3 and GluA4) che si combinano per formare tetrameri. La maggior parte degli AMPAR sono eterotetrameri, costituiti cioè da dimeri 'simmetrici' di GluA2 e GluA1, GluA3 o GluA4 che fisiologicamente sono permeabili agli ioni sodio ( $\text{Na}^+$ ) e impermeabili agli ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La presenza o l'assenza della subunità GluA2 all'interno del recettore ha un profondo impatto sull'assemblaggio del canale e soprattutto sulla selettività ionica di questi recettori. Infatti, gli AMPAR che contengono la subunità GluA2 sono impermeabili al  $\text{Ca}^{2+}$ , mentre quelli che mancano di questa subunità diventano permeabili al

$\text{Ca}^{2+}$ . La  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilità di questi recettori è stata descritta come meccanismo di degenerazione neuronale in numerose patologie, incluse le dipendenze patologiche.

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di studiare il ruolo dei recettori AMPA  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabili nella tossicità indotta dall'astinenza da etanolo in fettine organotipiche ippocampali di ratto. Le fettine sono quindi state esposte a etanolo (150 mM) per 7 giorni seguite da 24h di astinenza e analizzate da un punto di vista molecolare e funzionale attraverso varie tecniche sperimentali (espressione dei livelli di proteina, localizzazione in membrana e proprietà elettriche degli AMPAR). Abbiamo osservato che l'astinenza da etanolo induce cambiamenti nella composizione in subunità degli AMPAR che portano alla formazione di canali AMPA privi della subunità GluA2, quindi permeabili al  $\text{Ca}^{2+}$ . Siamo quindi andati a studiare il *trafficking* di questi recettori nelle densità arricchite dalle postsinapsi e abbiamo osservato una riduzione significativa dell'espressione di entrambe le subunità AMPA (GluA1 e GluA2) accompagnata da una ridotta espressione delle proteine di sostegno (GRIP e SAP97) e di adesione (N-caderina) di questi recettori alle membrane postsinaptiche. Questi risultati ci hanno suggerito che l'etanolo non solo fosse in grado di modificare la composizione e la selettività ionica dei canali AMPA, ma anche la loro localizzazione e il loro *trafficking*. Per avere una evidenza più diretta di questo meccanismo, abbiamo utilizzato un protocollo sperimentale che ci ha permesso di misurare simultaneamente le risposte elettrofisiologiche e di fluorescenza del calcio indotte dalla stimolazione degli AMPA. Sorprendentemente, i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'astinenza da etanolo aumenta la neurotrasmissione AMPAergica, responsabile della morte neuronale provocata dall'etanolo, ma questo meccanismo di morte non è direttamente dipendente dagli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  che passano

attraverso questi canali. Per dimostrare il coinvolgimento di questi canali nella morte indotta dall'astinenza da etanolo abbiamo testato l'effetto neuroprotettivo dell'antagonista selettivo dei recettori AMPA  $Ca^{2+}$ -permeabili N-acetyl spermina (NASMP) sulla neurotossicità indotta dall'astinenza da etanolo, ottenendo una significativa neuroprotezione (Gerace *et al.*, 2021).

In conclusione, l'astinenza da etanolo porta alla formazione di recettori AMPA privi della subunità GluA2, che sono mediatori della neurotossicità da etanolo. Questi studi suggeriscono che i recettori AMPA privi della subunità GluA2 possono essere considerati dei nuovi bersagli terapeutici per lo sviluppo di farmaci neuroprotettivi nella sindrome da astinenza da etanolo.

### **Valutazione *in vitro* degli effetti diretti del glifosato sui linfociti T helper**

**Ambra Maddalon**

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

*Vincitrice Borsa di Studio SITOX-NFI - Nutrition Foundation of Italy per migliore Poster, 20° Congresso Nazionale della SITOX*

Il glifosato è l'erbicida più utilizzato al mondo. Il suo uso eccessivo ha fatto emergere sospetti relativi alla sicurezza di questo prodotto e ai possibili effetti avversi sull'uomo. Le principali agenzie regolatorie lo definiscono sicuro ai livelli ammessi per legge, ma studi recenti hanno evidenziato la possibilità che anche esposizioni a bassi livelli, definiti ambientali, possano avere degli effetti a livello del sistema immunitario. Il mio studio ha voluto indagare gli effetti del glifosato sui linfociti T helper (Th). Queste cellule del sistema immunitario hanno la

funzione di produrre citochine (come IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-17) in risposta a stimolazione antigenica. I linfociti Th si possono differenziare in 3 classi principali (Th1, 2 e 17), caratterizzate da diverse funzioni effettrici. Questo studio è stato effettuato su cellule mononucleate provenienti da sangue periferico di donatori sani. Il principale effetto riscontrato a seguito di esposizione a glifosato è stato uno sbilanciamento tra Th1 e Th2, con una marcata riduzione dei Th1, osservabile anche con la riduzione nella produzione di IFN- $\gamma$  e un aumento di IL-4. Grazie all'utilizzo di un inibitore del recettore degli estrogeni, basandosi su precedenti studi presenti in letteratura, si evince la possibilità che l'effetto osservato a livello linfocitario sia mediato da questo recettore. Suggestendo che gli effetti immunomodulatori del glifosato siano legati ad un'interferenza endocrina.

Inoltre, per meglio caratterizzare il meccanismo d'azione del glifosato sul sistema immunitario, è stata valutata la modulazione della produzione di alcuni miRNA, piccole molecole di RNA con un'azione prettamente di regolazione dell'espressione genica. In particolare, il glifosato è stato in grado di aumentare la produzione di miR-500a, un miRNA poco investigato che abbiamo dimostrato essere associato alla riduzione di IFN- $\gamma$  indotta dal glifosato.

I risultati ottenuti da questo studio dimostrano la capacità del glifosato di agire direttamente sulle cellule immunitarie, con meccanismi riconducibili ad un'azione simil estrogenica e all'induzione di miR-500a.

## **Effetto protettivo di un estratto del succo di bergamotto ricco di flavonoidi, da solo o in associazione con curcumina e resveratrolo, in un modello murino di tossicità testicolare indotta da cadmio**

**Laura Musumeci**

*Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina*

*Vincitrice Borsa di Studio SITOX-NFI - Nutrition Foundation of Italy per migliore Poster, 20° Congresso Nazionale della SITOX*

Negli ultimi decenni, la capacità dei fattori ambientali di influenzare la salute dell'uomo è diventata sempre più evidente, tanto che gli inquinanti chimici e fisici sono ormai considerati una delle più importanti minacce per la salute pubblica. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che circa un quarto delle malattie sia dovuto all'esposizione prolungata ad inquinanti ambientali, e che l'inquinamento atmosferico sia tra i principali fattori di rischio per le malattie cronico-degenerative e cardiovascolari, per le morti premature e le disfunzioni del sistema riproduttivo, in cui agiscono da interferenti endocrini, alterando la comunicazione intercellulare e l'equilibrio ormonale (Manisalidis *et al.*, 2020).

Nell'ultimo decennio, è stato suggerito che il sistema riproduttivo è particolarmente suscettibile agli inquinanti ambientali, tanto da fungere da "sentinella" degli stress ambientali, come evidenziato da diversi dati epidemiologici e clinici sull'infertilità maschile (Bergamo *et al.*, 2016; Vecoli *et al.*, 2017; Lettieri *et al.*, 2020).

A partire dagli anni '40 del secolo scorso, l'incidenza dell'infertilità maschile è aumentata costantemente in molti paesi industrializzati, dove è stata osservata una

correlazione tra l'aumento di sostanze chimiche nell'ambiente ed i cambiamenti nella produzione di sperma (Agarwal *et al.*, 2015). Inizialmente si pensava che l'apparente aumento dei disturbi dello sviluppo dell'apparato riproduttivo maschile (cancro del testicolo, criptorchidismo, ipospadia, basso numero di spermatozoi) potesse essere causato dall'aumentata esposizione agli estrogeni durante il periodo fetale/neonatale (Sharpe *et al.*, 2003). Sulla base delle conoscenze attuali, oggi, si ritiene che questi effetti possano essere ascrivibili anche a diverse sostanze chimiche in grado di modulare l'attività del sistema endocrino, gli interferenti endocrini artificiali, che possono derivare da processi industriali (idrocarburi policiclici aromatici o IPA), agricoli (pesticidi) e di combustione (dei rifiuti -diossine- e degli pneumatici) o dai materiali di consumo (i plastificanti, gli ftalati ed il bisfenolo A) o di costruzione (policlorobifenili o PCB). Gli interferenti endocrini artificiali includono anche i metalli pesanti, tra i quali piombo, mercurio, nickel, arsenico e cadmio, che possono trovarsi in elevate quantità nelle acque e negli alimenti, ma sono presenti anche nel fumo di sigaretta. Per questa ragione, la comunità scientifica è alla ricerca di nuove strategie volte a limitare gli effetti nocivi degli inquinanti ambientali sui disordini del sistema riproduttivo. Ciò ha determinato un crescente interesse dei ricercatori nei riguardi di prodotti naturali, i quali possono rappresentare uno "scudo" contro gli insulti provenienti dall'ambiente circostante. In questo contesto, un ruolo fondamentale è occupato dalla dieta mediterranea, modello fondamentale per diete nutrizionalmente ricche ed equilibrate, caratterizzata da un elevato apporto di frutta e verdura, le quali, a loro volta, sono ricche di sostanze detossificanti ed antiossidanti, come i flavonoidi, in grado di contrastare gli effetti nocivi dell'inquinamento derivanti dall'esposizione agli inquinanti ambientali. Come suggerito in una recentissima revisione della letteratura scientifica (Montano *et*

al., 2022), i flavonoidi promuovono l'eliminazione degli inquinanti dai tessuti e dai fluidi e/o ne attenuano gli effetti attraverso diversi meccanismi molecolari.

In questo contesto, uno studio recente (Ferlazzo *et al.*, 2021) ha messo in luce gli effetti protettivi di un estratto del succo di bergamotto (BJe), ricco in flavonoidi, da solo o in combinazione con resveratrolo (Re) e curcumina (Cur) in un modello murino di disfunzione testicolare indotta dal cadmio, il quale nell'uomo abbassa la qualità dello sperma, induce infertilità (Benoff *et al.*, 2009), ritarda la pubertà e riduce la crescita delle gonadi (Interdonato *et al.*, 2015). Questa ricerca (Ferlazzo *et al.*, 2021) è stata condotta utilizzando topi, a cui, per quattordici giorni, veniva somministrato cloruro di cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) per via intraperitoneale, insieme a BJe, Re e Cur, assunti per via orale. A livello testicolare, l'esposizione al  $\text{CdCl}_2$  ha determinato un aumento dell'espressione genica di markers infiammatori (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) ed una modulazione di geni coinvolti nel processo apoptotico (incremento di p53 e BAX e riduzione di Bcl-2), oltre ad indurre lesioni dei tubuli seminiferi e l'apoptosi delle cellule germinali. Tali effetti sono risultati significativamente ridotti negli animali trattati con BJe, il quale ha limitato il danno testicolare indotto dal cadmio, attraverso un meccanismo di tipo anti-infiammatorio ed anti-apoptotico. Inoltre, i risultati dello studio indicano che l'associazione del BJe con Cur e Re può amplificare il suo effetto protettivo, suggerendo una possibile nuova strategia per prevenire e contenere il danno testicolare in soggetti esposti all'inquinamento ambientale da metalli pesanti.

## Bibliografia

Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015 Apr 26; 13:37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1. PMID: 25928197; PMCID: PMC4424520.

Benoff S, Hauser R, Marmar JL, Hurley IR, Napolitano

B, Centola GM. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Mol Med.* 2009 Jul-Aug;15(7-8):248-62. doi: 10.2119/molmed.2008.00104. PMID: 19593409; PMCID: PMC2704265.

Bergamo P, Volpe MG, Lorenzetti S, Mantovani A, Notari T, Cocca E, Cerullo S, Di Stasio M, Cerino P, Montano L. Human semen as an early, sensitive biomarker of highly polluted living environment in healthy men: A pilot biomonitoring study on trace elements in blood and semen and their relationship with sperm quality and RedOX status. *Reprod Toxicol.* 2016 Dec; 66:1-9. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.07.018. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27592743.

Ferlazzo N, Micali A, Marini HR, Freni J, Santoro G, Puzolo D, Squadrito F, Pallio G, Navarra M, Cirimi S, Minutoli L. A Flavonoid-Rich Extract from Bergamot Juice, Alone or in Association with Curcumin and Resveratrol, Shows Protective Effects in a Murine Model of Cadmium-Induced Testicular Injury. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021 Apr 21;14(5):386. doi: 10.3390/ph14050386. PMID: 33919028; PMCID: PMC8142973.

Interdonato M, Pizzino G, Bitto A, Galfo F, Irrera N, Mecchio A, Pallio G, Ramistella V, De Luca F, Santamaria A, Minutoli L, Marini H, Squadrito F, Altavilla D. Cadmium delays puberty onset and testis growth in adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015 Sep;83(3):357-62. doi: 10.1111/cen.12704. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25521350.

Lettieri G, D'Agostino G, Mele E, Cardito C, Esposito R, Cimmino A, Giarra A, Trifuoggi M, Raimondo S, Notari T, Febbraio F, Montano L, Piscopo M. Discovery of the Involvement in DNA Oxidative Damage of Human Sperm Nuclear Basic Proteins of Healthy Young Men Living in Polluted Areas. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 12;21(12):4198. doi: 10.3390/ijms21124198. PMID: 32545547; PMCID: PMC7349829.

Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front Public Health.* 2020 Feb 20; 8:14. doi: 10.3389/fpubh.2020.00014. PMID: 32154200; PMCID: PMC7044178.

Montano L, Maugeri A, Volpe MG, Micali S, Mirone V, Mantovani A, Navarra M, Piscopo M. Mediterranean Diet as a Shield against Male Infertility and Cancer Risk Induced by Environmental Pollutants: A Focus on Flavonoids. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 29;23(3):1568. doi: 10.3390/ijms23031568. PMID: 35163492; PMCID: PMC8836239.

Sharpe RM. The "oestrogen hypothesis"- where do we stand now? *Int J Androl.* 2003 Feb;26(1):2-15. doi: 10.1046/j.1365-2605.2003.00367.x. PMID: 12534932.

Vecoli C, Montano L, Borghini A, Notari T, Guglielmino A, Mercuri A, Turchi S, Andreassi MG. Effects of Highly Polluted Environment on Sperm Telomere Length: A Pilot Study. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 4; 18(8):1703. doi: 10.3390/ijms18081703. PMID: 28777293; PMCID: PMC5578093.

## **L'uso di un sistema 3D di epitelio intestinale umano per studiare il ruolo dei trasportatori nell'assorbimento intestinale delle microcistine**

**Nicoletta Santori\*, Laura Turco, Franca M. Buratti, Emanuela Testai**

*Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Salute, Roma*

*\*Vincitrice Borsa di Studio SITOX-NFI - Nutrition Foundation of Italy per migliore Poster, 20° Congresso Nazionale della SITOX*

Le MC sono prodotti secondari del metabolismo dei cianobatteri (CB): la presenza di questi microorganismi sta aumentando nei corpi idrici superficiali a causa di vari fattori tra cui l'eutrofizzazione delle acque per attività antropiche e i cambiamenti climatici. La via principale di esposizione per l'uomo alle MC è quella orale mediante ingestione di cibo (prodotti ittici, integratori alimentari) o acqua contaminata (Buratti *et al.*, 2017). Sono conosciuti più di 200 congeneri di MC, eptapeptidi che si differenziano per gli amminoacidi in posizione 2 e 4 e altre modifiche tra cui demetilazioni in varie posizioni. Le MC sono epatotossiche e neurotossiche; l'effetto iniziale del loro meccanismo di azione è l'inibizione delle fosfatasi proteiche 1 e 2A (PP1 e PP2A) con conseguente accumulo di proteine fosforilate nel fegato (Preece *et al.*, 2017), principale organo target. Gli effetti prodotti possono essere più o meno gravi, legati al livello di contaminazione ed ai tempi di esposizione, possono andare dall'alterazione lieve dei biomarcatori di danno epatico (ALT, AST and  $\gamma$ -GT) ad epatiti gravi per uso prolungato di cibo o integratori contaminati (Buratti *et al.*, 2017). È stato dimostrato inoltre che possono comportarsi da promotori tumorali, per questo la MC-LR è stata classificata dalla IARC (*International Agency Research of Cancer*) nel 2006 come possibile cancerogeno per

l'uomo (Cat. 2B) (Funari and Testai, 2008). La loro tossicità acuta è congenere-specifica e sembra essere legata alle differenze dell'attività metabolica degli enzimi e dei trasportatori coinvolti nel loro assorbimento (Santori *et al.*, 2020, Fischer *et al.*, 2010; WHO, 2020), visto che la capacità inibitoria delle fosfatasi è abbastanza simile (Hoeger *et al.*, 2007; Monks *et al.*, 2007; Altaner *et al.*, 2019). La detossificazione delle MC avviene mediante coniugazione con il glutatione ridotto (GSH), reazione che avviene spontaneamente, ma che è anche catalizzata dalle Glutatione-S-Trasferasi (GST) (Buratti *et al.*, 2011). Le MC non sono soggette a trasporto passivo ed è noto che attraversano la barriera degli epatociti per trasporto attivo mediato da specifiche isoforme di *Organic Anion Transporting Polypeptide* (OATP) (Fischer *et al.*, 2005, 2010; Bulc Rozman *et al.*, 2017). Non ci sono informazioni invece sul trasporto intestinale.

In questo lavoro è stato determinato l'assorbimento intestinale di 5 congeneri (MCLR, RR, YR, LF e LW) utilizzando un sistema *in vitro* 3D, ricostituito a partire da cellule intestinali umane di singolo donatore, Epintestinal™, che riproduce l'anatomia *in vivo* della barriera gastrointestinale e la sua funzionalità. È un sistema complesso che, rispetto ad altri sistemi *in vitro*, mantiene l'espressione dei vari trasportatori di membrana (efflusso e influsso) ed enzimi di fase I e II. Nel sistema Epilntestinal™ si distinguono 2 comparti: apicale (A), che riproduce il lume intestinale, e basolaterale (BL), che riproduce la circolazione sanguigna, separati dall'epitelio intestinale.

L'assorbimento cellulare è un meccanismo complesso, un equilibrio tra l'*uptake* e l'efflusso. Per questo è stato studiato il coinvolgimento dei trasportatori di membrana più espressi a livello intestinale: per l'efflusso: P-gP (Glicoproteina P), MRP2 (*multidrug resistance protein*) e BCRP (*Breast cancer resistance protein*), e per i trasportatori di as-

sorbimento, OATP2B1 e OATP1A2 (*Organic Anion Transporting Polypeptide*).

Il primo passo è stato verificare la presenza dei trasportatori oggetto di studio nel sistema *in vitro* utilizzato mediante *western blotting*, mentre l'attività è stata determinata utilizzando un sistema substrato/inibitore il più specifico possibile per il trasportatore da analizzare. Da questi dati è emerso che tutti i trasportatori oggetto di studio erano presenti e funzionanti. È stata verificata anche la presenza della GST, enzima in grado di detossificare le MC.

Il trasporto delle MC è stato determinato mediante la velocità di passaggio attraverso l'epitelio intestinale espressa come coeffi-

ciente di permeabilità Papp:  $P_{app} = \frac{\left(\frac{dQ}{dt}\right)}{C_0 \cdot A}$

Dove  $dQ/dt$  rappresenta il flusso,  $C_0$  la concentrazione iniziale e  $A$  l'area del monostato di epitelio.

Durante gli esperimenti è stata impiegata una concentrazione di MC (10-40  $\mu\text{M}$ ) ritenuta rappresentativa di un'esposizione reale (considerando i dati disponibili di contaminazione di prodotti ittici ed un consumo giornaliero plausibile) (Testai *et al*, 2016). Dopo un'incubazione di 4 ore i valori di Papp rilevati per i congeneri più idrofili (MCLR, YR e RR) sono indipendenti dalle concentrazioni usate: il valore, infatti, varia in un range da 2,95 a 3,54 ( $\times 10^{-7}$ )  $\text{cm}^2/\text{sec}$ , mentre è stato evidenziato un aumento dose-dipendente nella permeabilità dei congeneri più lipofili, LW e LF, per i quali, solo a 40  $\mu\text{M}$ , i valori di Papp  $\times 10^{-7}$  hanno raggiunto valori simili agli altri congeneri. L'assorbimento di MC-RR è il più rapido, evidente già dopo 30 minuti, e lineare nel tempo; per gli altri congeneri è invece più lento. MC-RR, LR, YR mostrano valori di assorbimento  $<5\%$  della dose somministrata, calcolata relativamente alla presenza di MC nel comparto basolaterale (essendo le MC assenti nel lisato

cellulare). Invece le MC-LW e LF, a causa della loro lipofilità, sono stati rilevate anche all'interno del compartimento cellulare, dovuto probabilmente all'interazione con la membrana lipidica.

Per evidenziare il possibile coinvolgimento anche di trasportatori di efflusso nell'assorbimento delle MC è stato studiato il passaggio bidirezionale di 2 congeneri rappresentativi delle varianti idrofile e lipofile, LR e LW rispettivamente. Convenzionalmente è definito che se il rapporto tra Papp (BL-A) e (A-BL) è maggiore di 2 allora la sostanza analizzata è substrato di un trasportatore di efflusso. Nel nostro caso entrambe le cianotossine (LR e LW) sono substrati sia dei trasportatori di efflusso che di assorbimento. In particolare, poiché la co-somministrazione di un inibitore della P-gp (verapamil) non altera i risultati, si può concludere che le MC non sono substrati di P-gp, mentre la ciclosporina (inibitore delle MRP2) ha ridotto l'efflusso di MCLR e l'afflusso di MCLW, indicando quindi il ruolo di MRP2 nel trasporto delle MC.

Per verificare il ruolo degli OATP nell'uptake delle MC è stato utilizzato un cocktail di inibitori per i trasportatori di efflusso (digossina e benzbromarone); inoltre sono stati inibiti alternativamente OATP 1A2 e 2B1 utilizzando rispettivamente naringina e pravastina. Poiché l'utilizzo degli inibitori degli OATP non ha prodotto alcun effetto eccetto che per MCLW, per cui si nota una leggera diminuzione dell'influsso quando è stata utilizzata la pravastatina come inibitore della 2B1.

Relativamente alla biotrasformazione delle MC, in nessun esperimento è stata riscontrata la formazione del coniugato MC-glutatione, anche se mediante le analisi di caratterizzazione di Epilntestinal™ è stata rilevata l'espressione delle GST. Ciò potrebbe essere dovuto alla formazione di coniugato al di sotto del LOD del metodo HPLC

utilizzato, a ulteriori passaggi metabolici per formare MC-Cys o alla reversibilità della reazione che porta alla de-coniugazione del parentale (Miles *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018)).

I risultati cinetici indicano che l'assorbimento intestinale delle MC è un meccanismo complesso caratterizzato dall'equilibrio tra trasporto di assorbimento ed efflusso, infatti i congeneri analizzati sono substrato di entrambi. L'assorbimento intestinale può essere attribuito soltanto parzialmente alle OATP e ciò potrebbe essere dovuto a diversi fattori, come il coinvolgimento di altre proteine di assorbimento non prese in esame come gli OCT (*Organic Cation Transporter*) o la capacità inibitoria sovrapposta dei composti di riferimento utilizzati con conseguente potenziamento dell'azione opposta del trasportatore di efflusso. Dai nostri dati è evidente che le MC sono substrati di MRP2, ma non di P-gp e inoltre emerge anche il ruolo di BCRP dovuto all'azione della naringina che, agendo da inibitore su OATP1A2 e BCRP contemporaneamente, non riesce a bloccare l'uptake, con conseguente aumento dell'assorbimento netto.

I nostri risultati evidenziano anche che l'utilizzo di EpilIntestinal™, in grado di rappresentare verosimilmente la situazione *in vivo*, ci permette di valutare una situazione complessa come i processi multi-trasporto. EpilIntestinal™ si differenzia dalle classiche linee cellulari come le Caco-2; queste ultime infatti presentano caratteristiche degli enterociti, ma non sono originate dall'intestino tenue (essendo derivazione di cellule del colon), quindi non rappresentano pienamente la situazione *in vivo* e hanno limitazioni nella valutazione di assorbimento di sostanze soggette a trasporto attivo e con assorbimento limitato (Turco *et al.*, 2011).

I nostri dati quindi rappresentano un piccolo tassello alla comprensione della cinetica delle MC, infatti le informazioni riguardo l'assorbimento e il metabolismo intestinale

di sostanze chimiche e contaminanti ambientali è ancora limitato per questo è fondamentale migliorare e implementare la ricerca su questi aspetti per diminuire le incertezze nella valutazione del rischio. I dati qui presentati sono stati descritti in un lavoro inviato a *Frontiers in Toxicology* per la pubblicazione.

## Bibliografia

Altaner, S., Jaeger, S., Fotler, R., Zemskov, I., Wittmann, V., Schreiber, F., Dietrich, D.R., 2019. Machine learning prediction of cyanobacterial toxin (microcystin) toxicodynamics in humans. *ALTEX* (Jul 2). <https://doi.org/10.14573/altex.1904031>.

Bulc Rozmana, K., Juric, D.M., Šuput, D. (2017). Selective cytotoxicity of microcystins LR, LW and LF in rat astrocytes. *Toxicol. Lett.* 265, 1–8.

Buratti F.M., Scardala S., Funari E. and Testai E. (2011). Human Glutathione Transferases Catalyzing the Conjugation of the Hepatoxin Microcystin-LR. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 6, 926–933

Buratti F.M., Manganelli M., Vichi S., Stefanelli M., Scardala S., Testai E., Funari E. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action, and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology* 91:1049–1130 (2017) doi: 10.1007/s00204-016-1913-6.

Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257–263.

Fischer, A., Hoeger, S.J., Stemmer, K., Feurstein, D.J., Knobloch, D., Nussler, A., Dietrich, D.R. (2010). The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners *in vitro*: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 9–20.

Funari E. and Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Rev. Toxicol.*, 38, 97-126 (2008).

Hoeger, S.J., Schmid, D., Blom, J.F., Ernst, B., Dietrich, D.R., 2007. Analytical and functional characterization of microcystins [Asp3]MC-RR and [Asp3]MC-RR and [Asp3,Dhb7]MC-RR: consequences for risk assessment? *Environ. Sci. Technol.* 41, 2609–2616.

Miles CO, Sandvik M, Nonga HE, Ballot A, Wilkins AL, Rise F, et al. (2016). Conjugation of microcystins with thiols is reversible: base-catalyzed deconjugation for chemical analysis. *Chem Res Toxicol.* 29(5):860–70.

Monks, N.R., Liu, S., Xu, J., Yu, H., Bendelow, A.S., Moscow, J.A., 2007. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Mol. Cancer Ther.* 6, 587-598.

Li W, He J, Chen J, Xie P (2018). Excretion pattern and dynamics of glutathione detoxification of microcystins in Sprague Dawley rat. *Chemosphere.* 191:357-64.

Preece E. P., Hardy F. J. Moore B. C., Bryan M., 2017, A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk, *Harmful Algae* 61, 31-45

Santori N., Buratti F. M., Scardala S., Dorne J. L. C.M., Testai E., 2020b, In vitro detoxication of microcystins in human samples: variability among variants with different hydrophilicity and structure, *Toxicology Letters*, Volume 322, Pages 131-139

Testai E., Buratti F.M., Funari E., Manganelli M., Vichi S., Arnich N., Biré R., Fessard V., A. Sialehaamo, Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. EFSA supporting publication 2016: EN-998. 309 pp. (2016).

Turco L., Catone T., Caloni F., Di Consiglio E., Testai E. and Stammati A. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology In Vitro* (2011) 25: 13-20.

WHO World Health Organization) (2020) Cyanobacterial toxins: microcystins - Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments WHO/HQP/ECH/WSH/2020.6.

## Sigarette elettroniche: un prezioso alleato o un insidioso nemico?

**Fabio Vivarelli\*, Donatella Canistro**

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna, Bologna

\*Vincitore Borsa di Studio SITOX-Farmindustria per migliore Comunicazione Orale Sessione "Prof. Pier Francesco Mannaioni", 20° Congresso Nazionale della SITOX

Con oltre 7 milioni di decessi per anno, l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha stigmatizzato l'abitudine al fumo di tabacco come la più vasta epidemia con cui l'umanità si sia mai dovuta confrontare. Sin dal loro lancio, i dispositivi elettronici

per il rilascio di nicotina (DERN), o sigarette elettroniche (*e-cigarettes; e-cigs*), sono stati acquistati da milioni di persone ed è stato ipotizzato, e fortemente auspicato da una parte della comunità medico scientifica, che le vendite supereranno in futuro quelle delle sigarette tradizionali. Le stesse compagnie del tabacco considerano la diffusione di questi nuovi dispositivi come una rivoluzione epocale: per la prima volta viene offerto al fumatore la possibilità di astenersi dal fumo di tabacco, pur mantenendo la possibilità di assumere nicotina aspirando ed esalando vapore da un sistema che consente di simulare, dal punto di vista della gestualità, il naturale comportamento del soggetto tabagista.

Le sigarette elettroniche di prima generazione, talvolta anche nominate "sigarette elettroniche a liquido", sono costituite da una batteria che eroga energia all'atomizzatore il quale, a sua volta, scaldere un liquido composto da glicole propilenico e glicerina vegetale a cui il consumatore può aggiungere nicotina a differenti concentrazioni e aromi.

Accolte con grande entusiasmo, il successo delle sigarette elettroniche è in continua ascesa. Sin dall'uscita dei primi modelli, nei paesi europei si diffondono le immagini di personaggi pubblici, dello spettacolo, *influencer* e politici ritratti nell'atto di *svapare*, contribuendo fortemente alla diffusione delle *e-cigs*. I giovani, in modo particolare, sono attratti dal loro *appeal* tecnologico e dalla possibilità di personalizzare la propria esperienza di *svapo*, acquistando nuove fragranze o combinazioni di esse e modificando la concentrazione di nicotina presente nel liquido. A questo si è associata una campagna pubblicitaria parziale che non ha puntato, almeno nei primi anni, a descrivere le caratteristiche del prodotto in termini di esperienza sensoriale, ma è stata orientata a comunicare come il dispositivo fosse scevro da ogni rischio. In alcuni foglietti illustrativi

che accompagnavano i primi modelli (commercializzati in Italia tra il 2009 e il 2012), si paragonava il vapore emesso dalla sigaretta elettronica a innocuo vapore acqueo.

E la comunità scientifica? Che posizione assunse in quel periodo? Nel 2012, l'anno del boom in Italia per vendite di sigaretta elettroniche, gli esperti non erano pronti a rispondere alle domande sulla sicurezza in merito a questi nuovi dispositivi. I dati in letteratura erano estremamente ridotti, insufficienti per formulare un serio parere di tipo tossicologico. Il fenomeno sigaretta elettronica esplose in Italia con l'apertura di oltre 3000 negozi per la sua vendita e relativi accessori. In quello stesso periodo iniziarono alcuni progetti di ricerca indipendenti a cui parteciparono alcuni membri della Società Italiana di Tossicologia - SITOX, allo scopo di studiare i possibili effetti tossicologici associati all'utilizzo di sigarette elettroniche. I primi studi furono coordinati dal gruppo di ricerca guidato dal Prof. Moreno Paolini e dalla Dott.ssa Donatella Canistro dell'Università di Bologna, con la partecipazione dei gruppi di ricerca diretti dalla Prof.ssa Maura Lodovici dell'Università di Firenze e dalla Prof.ssa Carmela Fimognari dell'Università di Bologna. I risultati, presentati nell'ambito del 18° e 19° Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia, rilevarono come il vapore emesso dalle sigarette elettroniche contenesse diversi composti tossici come formaldeide, acetaldeide e acroleina. Le evidenze ottenute tramite modelli espositivi *in vivo* mostrarono come l'esposizione ai vapori di sigaretta elettronica innescasse un processo pro-infiammatorio che ha portato ad un marcato danneggiamento delle vie aeree superiori e inferiori. Inoltre, alcuni test di mutagenesi restituirono esito positivo confermando l'ipotesi di rischio genotossico. Tali studi dimostrarono, inoltre, come le caratteristiche tecniche del dispositivo e la composizione del liquido influenzano in modo significativo l'emissione dei composti tossici, fino ad ottenere livelli di formaldei-

de, noto cancerogeno, maggiori di quelli normalmente misurati nel fumo di sigaretta convenzionale. I risultati ottenuti furono in seguito confermati da gruppi di ricerca europei e statunitensi. Ad oggi, se da un lato il dibattito sul rapporto rischio-beneficio in merito all'utilizzo della sigaretta elettronica è ancora acceso, c'è ampio consenso nel considerare l'utilizzo dei DERN non privo di rischi e questo messaggio è stato ben recepito anche a livello governativo. Nel 2013, il Ministero della Sanità ha analizzato con cura i dati disponibili in letteratura e la sigaretta elettronica è passata da essere venduta senza alcuna regolamentazione, ad essere proibita ai minori di diciotto anni, per poi alzare ancora il livello ed equipararla in tutto alla sigaretta tradizionale, con il conseguente ingente aumento della tassazione. Parallelamente, fa la sua comparsa sul mercato italiano una nuova sigaretta elettronica: il suo nome è IQOS, viene prodotta da Philips Morris International (PMI) e ha un meccanismo di funzionamento totalmente differente dalle sigarette elettroniche "a liquido". IQOS riscalda il tabacco senza bruciarlo, di conseguenza il risultato è l'emissione di un vapore che contiene nicotina, ma, evitando il processo di combustione, abbatte sensibilmente la concentrazione di prodotti tossici come, ad esempio, gli idrocarburi policiclici aromatici. IQOS è un successo e, per la prima volta, la *Food and Drug Administration* (FDA) attribuisce ad un prodotto del tabacco l'etichetta di "Prodotto a rischio modificato". Non solo, ma alcuni paesi europei hanno deciso di considerare l'utilizzo del dispositivo (pur non consentendo la prescrizione) nella terapia da disassuefazione da fumo di sigaretta tradizionale. Durante il 20° Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia, vengono presentati i risultati di uno studio *in vivo* sulla tossicità di IQOS. La ricerca che porta la firma dei soci SITOX Fabio Vivarelli, Donatella Canistro, Carmela Fimognari, Eleonora Turrini e Moreno Paolini, mostra come il vapore di IQOS presenti un drastico abbattimento delle specie chi-

miche tossiche normalmente presenti nel fumo di sigaretta; tuttavia, a livello polmonare, si riscontrano modificazioni importanti a livello di trachea e parenchima polmonare, così come effetti genotossici ed epigenetici tipicamente osservati nei modelli sperimentali di fumo di tabacco. Inoltre, si osserva un incremento di alcuni mediatori dell'infiammazione e alcuni marcatori proteici che hanno un ruolo riconosciuto nella progressione di alcune malattie croniche polmonari e cancro. Questi risultati sembrano indicare come, nonostante il significativo abbattimento dei composti dannosi, i livelli presenti nel vapore prodotto da IQOS siano sufficienti ad innescare quei meccanismi a livello cellulare che la letteratura scientifica riporta essere attivati dal fumo di tabacco.

Il dibattito sulla sigaretta elettronica spesso viene portato su un piano differente, cioè sul confronto con la classica sigaretta. Ad oggi, tuttavia, non siamo in possesso di dati clinici sugli effetti a lungo termine e gli studi condotti su modelli cellulari e animali impongono prudenza, la stessa prudenza che viene invocata con forza dagli editoriali di alcune prestigiose riviste mediche come *The Lancet*, giudicando irresponsabile la scelta di alcuni governi di contemplare la sigaretta elettronica come un "alleato" nella lotta al tabagismo. Sicuramente sono necessari ulteriori studi per cercare di delineare al meglio i contorni di questo fenomeno e poter procedere con un'adeguata valutazione del rischio per la salute. Ad oggi l'OMS ribadisce che i dati in merito all'efficacia delle sigarette elettroniche come aiuto nella disassuefazione da fumo di tabacco sono ancora insufficienti e che, al momento, non è possibile determinare se le *e-cigs* siano meno dannose rispetto alle sigarette tradizionali: entrambe comportano un rischio per la salute e l'approccio più opportuno dovrebbe essere l'astensione da entrambe.

## Bibliografia e sitografia essenziale

*British Medical Association, 2013. BMA calls for stronger regulation of e-cigarettes. London: BMA.*

*Bullen, C. et al. Electronic cigarettes for smoking cessation: a randomised controlled trial. The Lancet. 2013 382:1629-1637.*

*Canistro, D. et al. E-cigarettes induce toxicological effects that can raise the cancer risk. Sci Rep. 2017 7(1):2028.*

*Cirillo, S. et al. The customizable e-cigarette resistance influences toxicological outcomes: lung degeneration, inflammation and oxidative stress-induced in a rat model. Toxicol Sci. 2019 172 :132-145.*

*Flint, S.W. et al. 2018. The irresponsible promotion of e-cigarettes and Swaptober. Lancet Respir Med. 6, e3-e4.*

*Lee, H.W. et al. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Feb 13;115(7): E1560-E1569.*

*Purkayastha, BAT ramps-up e-cigarette expansion as sales go up in smoke international business times (July 31, 2013). [http://www.thefreelibrary.com/BAT Ramps-up E-cigarette Expansion as Sales Go Up in Smoke.-a0338323170](http://www.thefreelibrary.com/BAT+Ramps-up+E-cigarette+Expansion+as+Sales+Go+Up+in+Smoke.-a0338323170).*

*Vivarelli, F. et al. Unburned Tobacco Cigarette Smoke Alters Rat Ultrastructural Lung Airways and DNA. Nicotine Tob Res. 2021 Nov 5;23(12):2127-2134.*

*WHO, Tobacco\_e-cigarette*

*<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/tobacco-e-cigarettes>*

## Strategie innovative nella valutazione tossicologica delle sostanze chimiche

Costanza Rovida

CAAT-Europe e TEAM Mastery



ASPIS ([www.aspis-cluster.com](http://www.aspis-cluster.com)), abbreviazione di “*Animal free Safety assessment of chemicals: Project cluster for Implementation of novel Strategies*” è un cluster creato nell’ambito del progetto quadro Horizon 2020 della Commissione Europea e che unisce 3 progetti dedicati alla valutazione delle sostanze chimiche con metodi innovativi e *human relevant*. Nell’insieme, ASPIS raccoglie 70 partner distribuiti in 16 nazioni e beneficia di un finanziamento di 60 milioni di finanziamento europeo.

L’obiettivo comune è quello di utilizzare conoscenze trasversali per migliorare la accuratezza, velocità e sostenibilità dei test tossicologici sulle sostanze chimiche con esperimenti basati senza il coinvolgimento di animali da laboratorio. Il sistema si basa sui cosiddetti NAMs (*New Approach Methodologies*) che riuniscono metodi *in vitro* e *in silico*, strategie costruite con l’intelligenza artificiale e applicazioni di tecniche *omics*, raggruppando genomica, transcriptomica e metabolomica.

La necessità di un progetto di questo tipo nasce dall’esigenza di valutare la sicurezza delle migliaia di sostanze chimiche che ci

circondano e che restano per lo più prive di dati sperimentali a causa dei tempi lunghi e della mancanza di risorse che richiedono i test sugli animali, che tra l’altro possono risultare poco affidabili quando si tratta di prevedere effetti specifici sull’organismo umano. Dimostrando la validità dell’approccio NAM, ASPIS introduce una nuova era nella tossicologia in cui si studia l’effetto delle sostanze a livello molecolare, migliorando le valutazioni dei possibili rischi che si possono avere in seguito a esposizione.

I tre progetti che compongono il cluster ASPIS sono:



Precision Tox (<https://precisiontox.org>), che ha lo scopo di sviluppare metodi non convenzionali abbinati a un sofisticato approccio computazionale per studiare la tossicologia delle sostanze chimiche sulla salute umana. L’approccio si basa su sistemi *high-throughput* con modelli biomedici e cellule umane, utilizzando tecniche multi-omics e di intelligenza artificiale per identificare i primi passaggi delle *Adverse Outcome Pathways* (AOP) cioè la sequenza di eventi a livello molecolare e cellulare che possono portare a reazioni avverse in seguito a esposizione di sostanze chimiche. Gli organismi che saranno utilizzati saranno nematodi, mosche, pulci d’acqua oltre a embrioni di pesce e di rana. Lo scopo preciso sarà quel-

lo di valutare le differenze genetiche che si possono trovare in una popolazione.

## RISK [ : : : ] HUNT3R

RiskHunt3R ([www.risk-hunt3r.eu](http://www.risk-hunt3r.eu)), che è l'abbreviazione di "*RISK assessment of chemicals integrating HUMAN centric Next generation Testing strategies promoting the 3R*", ha lo scopo di sviluppare test basati su cellule umane o tessuti umani ricostituiti per valutare l'impatto a esposizioni ripetute di sostanze chimiche. Questo progetto è la continuazione del precedente EU-ToxRisk terminato al 31 dicembre 2021 e si focalizzerà principalmente su strategie di tossicocinetica e tossicodinamica per arrivare a costruire una NGRA (*Next Generation Risk Assessment*) interamente basata su test *in vitro* e accettata dagli enti regolatori, che tra l'altro partecipano ai lavori di questo progetto.



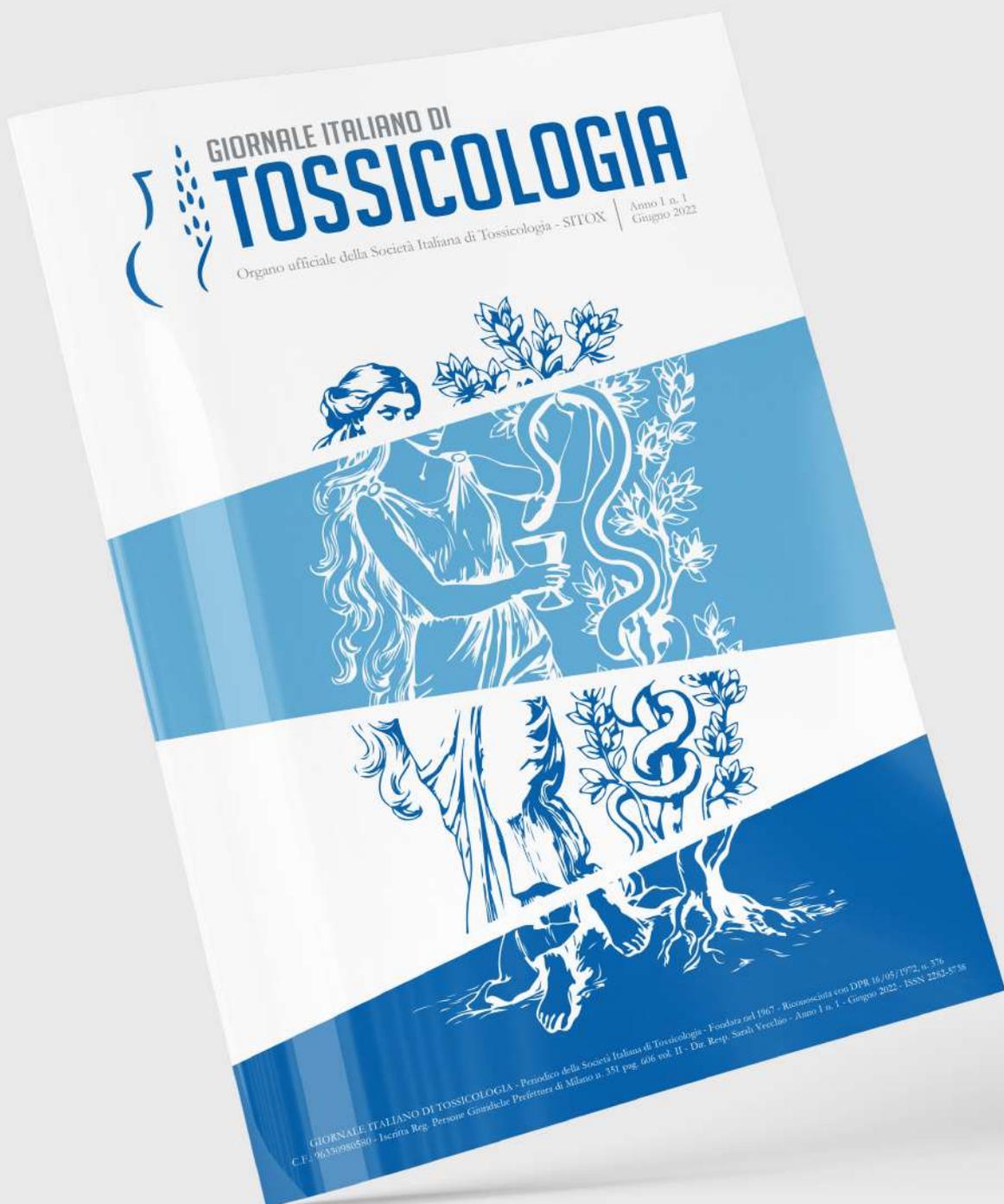
OnTox (<https://ontox-project.eu>), progetto dedicato alla NGRA per trasformare i dati ottenuti senza uso di animali in livelli di

esposizione che si possono considerare sicuri per la salute umana. Partendo da dati raccolti su NAMs specifici per fegato, reni, cervello durante lo sviluppo fetale e applicati con diverse sostanze chimiche, spaziando dai cosmetici, agli alimenti, ai biocidi e ai farmaci e aggiungendo dati epidemiologici, OnTox cercherà di predire l'effetto dato dall'esposizione tramite intelligenza artificiale. Il passaggio successivo sarà la costruzione di network di AOP che possono portare alla identificazione di test *in vitro* da effettuare per ottimizzare la previsione di tossicità delle sostanze chimiche.

Raccogliere questi tre progetti nell'unico cluster ASPIS, avrà il vantaggio di ottimizzare alcuni passaggi grazie alla condivisione dei dati, l'organizzazione di sessioni di training comuni e gruppi di lavoro unificati su temi di interesse comune. Molti saranno i dottorandi coinvolti nel lavoro e anche questo ha lo scopo di formare professionisti preparati nel campo dei NAMs e dei metodi senza animali, pronti a lavorare nell'ambito della tossicologia del futuro.

Il progetto è ambizioso, ma i partecipanti sono motivati e determinati a raggiungere gli obiettivi prefissati. Ci saranno anche momenti di dibattito pubblico all'interno di congressi e convegni pubblici, durante i quali sarà possibile verificare l'avanzamento dei lavori e magari contribuire con idee e proposte.

In anteprima la copertina del **Giornale Italiano di Tossicologia**



Siamo lieti di informarvi che 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 XXV n. 1 - Marzo 2022

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