

Cari soci

anche questo numero di SITOX Informa affronta temi caldi che stanno coinvolgendo la comunità scientifica e l'opinione pubblica, primo tra tutti la recente approvazione da parte del Senato dell'art.9-bis della legge di delegazione europea, che restringe gli ambiti della sperimentazione

Indice:

Cari soci - P. Hrelia.....	pag. 1
Il rischio tossicologico e la sperimentazione animale - C. L. Galli, M. Marinovich, I. Andreini.....	pag. 1
1. L'analisi del rischio nello sviluppo di nuove molecole ad uso umano	pag. 1
1.1. Introduzione sulla sperimentazione non-clinica e sua regolamentazione.....	pag. 1
1.2. Analisi del rischio.....	pag. 2
1.3. Identificazione del pericolo.....	pag. 2
1.4. Bibliografia.....	pag. 5
2. Test <i>in vivo</i> e test alternativi per la caratterizzazione del rischio tossicologico e la valutazione dell'efficacia e sicurezza dei farmaci: lo stato dell'arte.....	pag. 5
2.1. Introduzione.....	pag. 5
2.2. Laboratori in cui viene effettuata sperimentazione animale, i controlli.....	pag. 6
2.3. Fase preliminare della ricerca non-clinica: dati <i>in silico</i> e <i>in vitro</i>	pag. 6
2.4. Fase centrale della ricerca non-clinica: sperimentazione <i>in vivo</i>	pag. 7
2.5. Metodi alternativi.....	pag. 8
2.6. Bibliografia.....	pag. 8
3. Conclusioni.....	pag. 8
Lettera della SITOX alle Autorità C. Locatelli.....	pag. 9
<i>Consensus Document</i> - Valutazione ragionata del rischio dei distruttori endocrini - E. Testai, C. L. Galli, W. Dekant, M. Marinovich, A. H. Piersma, R. M. Sharpe.....	pag. 10
Antidotes in Depth 2013 - C. Prevaldi.....	pag. 12

animale. Non voglio esprimere commenti in questa sede, ma rimando all'articolo di Galli, Marinovich ed Andreini sull'analisi del rischio nello sviluppo di nuove molecole ad uso umano ed alla lettera, inviata con la Società Italiana di Farmacologia, alle Autorità competenti (ma invano) a nome dei tanti Ricercatori impegnati in ambiti di ricerca diversi, tutti finalizzati al mantenimento ed alla promozione della salute dell'uomo. Ricordiamo che la sperimentazione animale, oltre ad essere un obbligo legislativo, è un segmento di studio irrinunciabile e attualmente ancora insostituibile, per tutti quegli aspetti di tossicità e di risposta caratterizzati da elevata complessità biologica. Segue il *Consensus Document* sui distruttori endocrini, categoria di composti chimici di recente scoperta, per i quali sono stati proposti criteri identificativi ed approcci di valutazione del rischio associato alla loro esposizione.

A conclusione di questo numero, pubblichiamo una breve recensione all'appuntamento scientifico "Antidotes in Depth 2013", che ogni anno il Presidente SITOX, Dr. Carlo Locatelli, organizza a Pavia con il suo attivo team di collaboratori. Non mi resta che augurarvi una buona lettura.

Patrizia Hrelia

Il rischio tossicologico e la sperimentazione animale

Corrado L. Galli¹, Marina Marinovich¹ e Isabella Andreini²

(1. Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;
2. RTC S.p.A.)

1. L'analisi del rischio nello sviluppo di nuove molecole ad uso umano

1.1. Introduzione sulla sperimentazione non-clinica e sua regolamentazione

Tutte le sostanze chimiche o prodotti con cui uomini, animali o ambiente possono venire a contatto devono essere valutati per la sicurezza utilizzando i metodi più idonei e predittivi per lo

scopo. La legge italiana, in accordo a normative Europee ed internazionali, prevede che per la commercializzazione di farmaci ad uso umano o veterinario vengano eseguite prove di efficacia e sicurezza nella tutela del consumatore finale. Anche per tutti i prodotti chimici, come ad esempio additivi alimentari, detergenti, biocidi, pesticidi ed altre tipologie di sostanze chimiche, sono richieste numerose prove sperimentali che variano a seconda delle leggi Europee che li regolamentano; in questo caso l'obiettivo è quello di identificare i pericoli intrinseci legati alla tossicità della sostanza in esame e determinare il rischio emergente dall'esposizione ad essa al fine di approntare le necessarie precauzioni per i consumatori, i lavoratori addetti agli stabilimenti di produzione e per l'ambiente esposto a contaminazioni previste o accidentali dei prodotti in questione.

1.2. Analisi del rischio

L'analisi del rischio è un processo complesso che include tre fasi cruciali: valutazione e caratterizzazione del rischio, gestione del rischio e comunicazione del rischio. La prima, la valutazione del rischio, fornisce le fondamenta scientifiche sulle quali poggia tutta l'analisi del rischio. La valutazione del rischio include l'identificazione del pericolo e la sua caratterizzazione, la valutazione dell'esposizione, e la caratterizzazione del rischio, come anche codificato dalla Direttiva europea 93/67/CEE del 20.7.1993:

- L'identificazione del pericolo consiste nell'identificazione degli effetti avversi (su una base qualitativa) prodotti dalla sostanza in esame, quali ad esempio, neurotossicità, epatotossicità, difetti nei nascituri, ecc.; è quindi l'identificazione della potenziale tossicità delle sostanze chimiche - di quello in altre parole che potrebbero fare - delle loro proprietà tossiche intrinseche.

- La caratterizzazione del pericolo è invece incentrata sulla quantificazione dell'effetto avverso in base ad una relazione dose-risposta. In esperimenti ben fatti la caratterizzazione del pericolo dovrebbe essere in grado di identificare una dose senza effetto (avverso) (NOAEL: la più alta dose che non causa tossicità).

Queste due fasi derivano da appropriati esperimenti condotti su animali da laboratorio o sistemi alternativi purché convalidati.

Questa è ovviamente una semplificazione di un processo in cui entrano a far parte molti altri elementi quali fattori tossicocinetici, tossicodinamici, il meccanismo d'azione, le differenze fra specie e così via. Questo tuttavia è l'unico metodo scientificamente accettato

a livello internazionale, che può essere usato attualmente nella valutazione della gravità e della probabilità che un effetto avverso si verifichi in esseri umani o nell'ambiente in seguito all'esposizione in determinate condizioni ad una fonte di rischio, come ad esempio elevate quantità di sostanze chimiche destinate a curare un organismo o sostanze impiegate nell'industria alimentare durante la preparazione, lo stoccaggio e la commercializzazione di prodotti destinati all'alimentazione.

1.3. Identificazione del pericolo

1.3.1. Protocollo sperimentale

L'identificazione del pericolo riguardante il potenziale tossico di un agente chimico necessita dell'esecuzione di una vastissima batteria di sperimentazioni *in vivo* che prevedono lo studio delle proprietà tossicocinetiche e tossicodinamiche della sostanza in esame, al fine di conoscere gli aspetti quali-quantitativi legati all'assorbimento, al potenziale di bioaccumulo, alla distribuzione nei tessuti dell'organismo ospite, al metabolismo ed infine ai fattori legati alla sua eliminazione attraverso gli escreti (es. urine, feci, sudore, espirato, latte). Le prove proseguono con lo studio della tossicità acuta della molecola. Gli effetti genotossici *in vitro* ed *in vivo* sono studiati al fine di chiarire il potenziale della sostanza di interagire con il materiale genetico cellulare provocando effetti mutageni, clastogeni o di aneuploidia. Vengono compiute poi prove di tossicità che prevedono la somministrazione giornaliera della sostanza. Vengono condotti contemporaneamente degli esperimenti di tossicità dello sviluppo (teratogenesi) e altri, su più generazioni, per comprendere se la sostanza interferisce con il sistema riproduttivo degli animali e sulla fertilità. Le prove più rilevanti tossicologicamente sono senza dubbio quelle di cancerogenesi e/o di lungo termine compiute somministrando la sostanza in esame, giornalmente, per periodi dettati dai protocolli internazionali; la scelta di condurre esperimenti così gravosi deriva dal fatto che i risultati, ottenuti applicando la regola del "caso peggiore" (cioè più punitivo per la molecola ma precauzionale per l'individuo), sono in grado di fornire delle basi ottimali per poter estrapolare all'uomo il rischio derivante dal contatto con la sostanza in esame anche per tutto l'arco della vita.

1.3.2. Caratterizzazione del pericolo

Per ciò che riguarda sostanze come additivi alimentari, fitofarmaci, residui da imballaggio,

L'analisi del rischio è un processo complesso che include tre fasi cruciali: valutazione e caratterizzazione del rischio, gestione del rischio e comunicazione del rischio. Attualmente questo è l'unico metodo scientificamente accettato a livello internazionale.

sostanze derivate da processi tecnologici (es. calore), contaminanti accidentali, le regole internazionali prevedono il calcolo di dosi ammissibili per la salvaguardia della popolazione, quali Dose Giornaliera Ammissibile (DGA).

La caratterizzazione del pericolo viene compiuta applicando una semplice formula

DGA (ADI) =	$\frac{\text{NO(A)EL}}{\text{SF (UF)}}$
-------------	---

Ove:

DGA = (Dose Giornaliera Ammissibile o ADI, Acceptable Daily Intake) è la dose, espressa in mg/kg di peso corporeo, che può essere assunta giornalmente da un individuo adulto del peso medio di 60 kg anche per tutto l'arco della vita senza rischio apprezzabile per la salute allo stato delle conoscenze attuali;

NO(A)EL = (No Observed (A) Effect Level o Dose senza alcun effetto osservato) la più elevata concentrazione o quantità di una sostanza, espressa in mg/kg di peso corporeo, derivante da studi sperimentali, preferibilmente a lungo termine, o osservazioni epidemiologiche, che non causa effetti tossici (avversi), alterazioni morfologiche o funzionali, modificazioni della crescita corporea, dello sviluppo e della durata della vita del soggetto sperimentale in studio.

SF = (Safety Factor o Fattore di Sicurezza; UF, uncertainty factor, fattore di incertezza, secondo una più recente denominazione) è il fattore utilizzato per trasformare il NO(A)EL in ADI, per estrapolare cioè i risultati ottenuti nell'animale alla popolazione umana; è variabile (10, 100, 1000) e dipende dalla natura dell'effetto tossico, dalla tipologia di popolazione a rischio esposta e dalla qualità delle informazioni tossicologiche disponibili al momento della decisione.

La determinazione del NO(A)EL, che ricordiamo è un valore OSSERVATO nel corso dell'esperimento e non calcolato o estrapolato, dipende prima di tutto dalla scelta opportuna dei dosaggi nell'esperimento condotto nell'animale, in modo tale che la dose più alta produca un effetto dannoso che non deve essere osservato alla dose più bassa.

1.3.2.1 Valutazione della rilevanza degli effetti tossici per la specie umana

L'identificazione di un effetto dannoso in uno studio specifico dipende dalle dosi utilizzate, dal tipo di parametri misurati e dalla capacità di distinguere tra effetti tossici, derivanti dalla esposizione alla sostanza e non dal solo trattamento, e falsi positivi. Ad esempio, se si

osserva soltanto una leggera modifica in un particolare parametro al dosaggio intermedio, ma non agli altri dosaggi, diventa difficile distinguere tra un effetto veramente dannoso e un dato falsamente positivo, non essendoci una correlazione dose-risposta. Inoltre, la riduzione dell'aumento del peso corporeo collegata con un diminuito consumo di cibo è difficilmente interpretabile come effetto dannoso, perché la gradevolezza del cibo potrebbe essere influenzata dalla presenza di elevati livelli della sostanza in esame caratterizzata da proprietà organolettiche spiacevoli. Tuttavia una diminuzione ponderale dose-risposta è frequentemente usata per stabilire un livello di effetto in assenza di altre manifestazioni tossiche. Quando vengono compiuti più studi su diverse specie animali, i NO(A)EL sono calcolati per ciascuno studio. Il NO(A)EL usato per calcolare il valore di ADI sarà il No-Observed-Effect Level risultante dallo studio sull'animale che ha evidenziato un effetto tossico alla dose più bassa e nella specie più sensibile. Questo approccio è ragionevole quando gli studi sugli animali sono di durata simile (in relazione alla vita attesa della specie considerata) e di qualità simile, e non sono disponibili altri dati a questo riguardo. Tuttavia, se la qualità di un risultato è chiaramente superiore a quello di un altro e/o gli studi differiscono tra di loro per quanto riguarda la durata (lungo termine rispetto a breve termine), ai fini della scelta del NO(A)EL bisogna dare maggior peso agli studi con maggiore durata e qualità. Se sono disponibili dati metabolici e farmacocinetici, le specie più simili all'uomo relativamente agli effetti tossici sarebbero da preferire a quelle più sensibili nel calcolo dei NO(A)EL. Quando si analizza uno studio tossicologico e si definisce il NO(A)EL, occorre distinguere tra cambiamenti reversibili, legati a fenomeni di adattamento o a meccanismi di mantenimento dell'omeostasi, e risposte propriamente tossiche. Tra gli esempi del primo tipo di risposta possiamo citare: effetti lassativi da sovraccarico osmotico, ipertrofia epatica e induzione enzimatica microsomiale derivanti da alti dosaggi di sostanze metabolizzate dal fegato, riduzione dell'incremento ponderale o ingrossamento dell'intestino cieco derivanti da elevati livelli di sostanze non nutritive e attive osmoticamente, alterazione del peso del rene direttamente collegata alla quantità d'acqua filtrata dal rene stesso e infine rallentamento della crescita e del consumo alimentare collegati alla somministrazione nella dieta di una sostanza non gradevole al palato. Tuttavia, occorre fare attenzione nell'interpretazione di questi cambiamenti, che non devono automaticamente

L'identificazione di un effetto dannoso in uno studio specifico dipende dalle dosi utilizzate, dal tipo di parametri misurati e dalla capacità di distinguere tra effetti tossici e falsi positivi.

essere scartati come privi di importanza da un punto di vista tossicologico. Un rallentamento della crescita del peso corporeo collegato ad una corrispondente riduzione del consumo di cibo potrebbe essere dovuto ad anoressia tossica, piuttosto che ad una scarsa gradevolezza al palato della sostanza in esame.

In generale, nell'Unione Europea e a livello internazionale, questo approccio viene seguito per sostanze che provocano effetti tossici in organi e sistemi e/o per sostanze che causano effetti cancerogeni non legati a una primaria azione a carico del DNA, cioè per i cancerogeni non genotossici, per i quali si accetta l'esistenza di effetti legati a una soglia (cancerogeni epigenetici). Invece, per i cancerogeni genotossici il metodo di valutazione si basa oggi sul rapporto fra la dose cancerogena più bassa e l'esposizione umana (Margin of Safety, MoS), rapporto che deve essere, secondo la European Food Safety Agency (EFSA), superiore a 10.000 volte.

1.3.3. Evoluzione del concetto di ADI

Il concetto di ADI ha subito alcune evoluzioni. Il primo è quando viene applicato al campo dei contaminanti, cioè sostanze, per definizione, non aggiunte volontariamente agli alimenti (come invece gli additivi alimentari, per cui è nato il concetto di ADI). Infatti, il livello dei contaminanti negli alimenti (acqua compresa) è spesso difficile, se non impossibile, da controllare; può essere a volte sconosciuto e, poiché i contaminanti ovviamente non subiscono un processo pre-marketing di approvazione e la loro presenza dipende molto spesso dal contesto geologico dei territori, i legislatori possono non avere a disposizione sostanziose informazioni tossicologiche necessarie per la loro valutazione; una delle difficoltà oggettive deriva dal fatto che la maggior parte dei contaminanti hanno una limitata quantità di dati tossicologici. In questo caso quindi, UE, USFDA e WHO impiegano la terminologia di "assunzione giornaliera tollerabile" (TDI, tolerable daily intake) per identificare il limite di un contaminante negli alimenti, e per distinguerlo dall'ADI. Sostanzialmente, però, la procedura per calcolare il TDI non varia significativamente da quella dell'ADI. Il secondo cambiamento di terminologia rilevante si è avuto con l'introduzione del termine "reference dose, RfD", invece della ADI, introdotto per evitare l'uso di termini pregiudiziali quali sicurezza e accettabile, promuovere una maggiore consistenza nella valutazione dei composti non cancerogeni e mantenere una certa separazione fra valutazione e gestione del rischio. C'è però

una sottile differenza interpretativa: la definizione di ADI, come dose accettabile, lasciava intendere che livelli superiori fossero inaccettabili. Questa demarcazione fra accettabile e inaccettabile è contraria alla visione della maggior parte dei tossicologi, che ritengono l'ADI una stima relativamente grossolana di un livello di esposizione cronica che mostra un rischio irrilevante per l'uomo. I valutatori del rischio ritengono l'ADI una stima "morbida" i cui margini di incertezza possono allargarsi fino ad un ordine di grandezza.

1.3.4. L'approccio Benchmark Dose

In generale, l'approccio NOAEL/LOAEL per il calcolo dell'RfD è soggetto a un certo numero di limitazioni fra le quali (U.S. EPA, 1995):

- l'identificazione del NOAEL è spesso controversa
- esperimenti con bassa potenza danno NOAELS più alti
- la curva dose-risposta gioca un ruolo modesto nel determinare il NOAEL
- la definizione del NOAEL è limitata dalle dosi sperimentali selezionate.

Molte di queste limitazioni sono superate dall'uso dell'approccio BMD (U.S. EPA, 1995); di conseguenza questa via è preferibile nel definire l'RfD.

Sono stati sviluppati metodi che consentono l'impiego di tutta la curva dose-risposta nel ricavare un NOAEL, tutti basati su esperimenti *in vivo*. L'approccio benchmark (BM), per esempio, designa un determinato punto della curva dose-risposta (Benchmark Response) che corrisponde ad aumento basso, ma misurabile, del 1, 5 o 10% di incidenza di un effetto tossico; il limite inferiore di confidenza al 95% di un certo aumento (ad esempio, 1%, 5%, o 10%), al di sopra del valore di fondo, rappresenta il Point of Departure (PoD). La validità di usare la dose di riferimento, BMD, deriva dal fatto che essa viene calcolata sulla base di un modello dose-risposta entro o vicino all'intervallo sperimentale delle dosi. È stato ipotizzato che la BMD calcolata al limite inferiore di confidenza del 95% e pari ad un aumento del 10% in più di rischio (BMD_{10}) è paragonabile al LOAEL, mentre quella derivata, sulla base di un rischio aumentato al 5% (BMD_5), corrisponde al NOAEL. Analisi più recenti dei dati disponibili, tuttavia, indicano che il BMD_{10} è vicino al NOAEL. L'utilizzo di questo approccio ha diversi vantaggi: non è limitato dalle dosi selezionate sperimentalmente (e quindi può essere utilizzato qualora non si sia riusciti ad identificare un NOAEL), consentendo quindi di non ripetere gli esperimenti su animali, e può essere adattato alle dimensioni del campione e alle incertezze ad esso associate.

La maggior parte dei contaminanti negli alimenti ha una limitata quantità di dati tossicologici disponibili per la valutazione.

1.3.5. Valutazione dell'esposizione umana

La fase finale di tutto il processo è rappresentata dal confronto delle conoscenze accumulate relativamente al processo della identificazione/ caratterizzazione del pericolo con i dati raccolti sull'esposizione umana. È evidente che maggiore è la distanza tra l'ADI e il valore di esposizione e più elevata è la probabilità che gli individui non vadano incontro a un rischio per la loro salute. Il temporaneo e/o limitato nel tempo "sfondamento" dell'ADI deve essere comunque giudicato con ragionevolezza, poiché si deve costantemente tenere presente che l'ADI deriva comunque da un NOAEL, cioè "la più elevata concentrazione o quantità di una sostanza, espressa in mg/kg di peso corporeo, derivante da studi sperimentali cronici o osservazioni epidemiologiche, che non causa effetti tossici (avversi)" che, inoltre, è stata ulteriormente divisa per un fattore di almeno 100. In altre parole l'ADI non deve assolutamente essere considerata una soglia di tossicità, ma una soglia di sicurezza. Un discorso analogo deve essere ben chiaro nella mente del legislatore o da chi è preposto a giudicare la presenza di concentrazioni di una sostanza al di sopra dei "limiti di legge" (MRL); infatti superare i limiti imposti dalla legge, di solito estremamente cautelativi da un punto di vista sanitario, non è da correlare immediatamente ad un aumentato rischio tossicologico per le ragioni sopra esposte.

1.4. Bibliografia

- Barnes, D.G., Dourson, M.L., 1988. *Reference Dose (RfD): description and use in health risk assessments*. Regul. Pharmacol. Toxicol. 8, 471-486. Also at <http://www.epa.gov/IRIS/rfd.htm>.
- Carrington, P.D., 2008. *Freedom to err: the idea of natural selection in politics, schools, and courts*. William Mary Bill Rights J. 17, 1-42.
- Carrington CD, Bolger PM. *The limits of regulatory toxicology*. Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Mar 1; 243(2): 191-7.
- Crump, K., 1984. *A new method for determining allowable daily intakes*. Fundam. Appl. Tox. 4, 854-871.
- Daston, L., 1988. *Moralizing mathematics. Classical Probability in the Enlightenment*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, pp. 296-369.
- Dourson, M.L., Stara, J.F., 1983. *Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factors*. Regul. Pharmacol. Toxicol. 3, 224-238.
- EFSA (.2009) *Use of the benchmark dose approach in risk assessment. Guidance of the Scientific Committee*. The EFSA Journal 1150, 1-72.
- FAO/WHO (1958). *Procedures for the testing of intentional food additives to establish their safety for use*.

Second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 144, Geneva.

- Galli C.L., Marinovich M., Lotti M. *Is the acceptable daily intake as presently used an axiom or a dogma?* Toxicol Lett. 2008 Aug 15; 180(2): 93-9.
- International Programme on Chemical Safety, 1987. *Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. Environmental Health Criteria 70*. World Health Organization, Geneva.
- International Programme on Chemical Safety (2000). *Lead. WHO Food Additive Series 44*. World Health Organization, Geneva.
- Lehman, A.J., Fitzhugh, O.G., 1954. *100-Fold margin of safety*. Q. Bull. Assoc. Food Drug Officials 18, 33-35.
- Mantel, N., Bryan, W.R., 1971. *"Safety" testing of carcinogenic agents*. J. Natl. Cancer Inst. 27, 455-470.
- National Research Council, 1983. *Risk Assessment in the Federal Government*. National Academy Press, Washington, DC.
- Schwartz, J., 1993. *Beyond LOEL's, p values, and vote counting: methods for looking at the shapes and strengths of associations*. Neurotoxicology 14, 237-246.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996. *Proposed guidelines for carcinogen risk assessment*. Federal Register 61(79), 17960-18010.
- Wagner, W.E., 1995. *The science charade in toxic risk regulation*. Columbia Law Rev. 95, 1613-1720.

2. Test *in vivo* e test alternativi per la caratterizzazione del rischio tossicologico e la valutazione dell'efficacia e sicurezza dei farmaci: lo stato dell'arte

2.1 Introduzione

Per registrare un prodotto chimico o per iniziare la sperimentazione clinica su un nuovo farmaco è necessario seguire un programma di ricerca e sviluppo con protocolli stilati in accordo alle indicazioni contenute nelle linee guida di organizzazioni internazionali quali l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), l'EMA (Agenzia Europea dei Medicinali), l'FDA (Food & Drug Administration), l'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) e l'EPA (Environmental Protection Agency). Per la caratterizzazione dei rischi associati all'uso di farmaci o all'esposizione a sostanze chimiche, sono stati definiti dai vari organismi internazionali i requisiti inerenti al programma di sviluppo non clinico che viene affrontato in modo gerarchico. Si parte sempre da valutazioni basate sui dati di sicurezza pubblicati in letteratura e quindi

Il programma di sviluppo non clinico di un prodotto chimico viene affrontato in modo gerarchico, in accordo ai requisiti definiti dai vari organismi internazionali.

si valuta, basandosi sulla struttura chimica del prodotto, quale possa essere il profilo di sicurezza. Si procede quindi con test *in vitro* che utilizzano come sistema di saggio batteri, cellule isolate o tessuti ricostituiti o espantati. Questa prima fase dello sviluppo non-clinico viene affrontato con facilità da tutte le aziende per i costi contenuti e i rapidi tempi di esecuzione di queste ricerche.

Dopo aver raccolto i dati preliminari è spesso necessario procedere con una piena caratterizzazione della tossicità usando modelli più complessi. Laddove sia sufficiente, la sperimentazione *in vivo* si limita all'uso di una sola specie e in particolare si preferiscono modelli di roditori, le cui caratteristiche fisiopatologiche sono ben note ai tossicologi. Spesso però, per definire il profilo di sicurezza di un prodotto chimico o di un farmaco, è necessario confrontare i dati di studi su roditori con quelli su mammiferi più complessi come il cane, il maiale o la scimmia. Gli studi su modelli animali sono spesso lunghi, complessi e assai costosi; essi vengono effettuati per ottemperare a delle precise richieste regolatorie e, nel caso di farmaci, per minimizzare i rischi dei volontari che si sottoporranno alla sperimentazione clinica di un nuovo farmaco. Gli studi che utilizzano animali da laboratorio si devono attenere a severi requisiti di legge. Relativamente alle caratteristiche dei laboratori, allevamenti e personale coinvolto nella sperimentazione animale, in Italia la normativa attualmente applicata è il DdL 116/92¹.

Dal 1 gennaio 2013 tutti gli stati membri della Comunità Europea erano tenuti a recepire la direttiva europea 2010/63². Molti paesi l'hanno già recepita e in altri (come l'Italia) è in corso di recepimento.

2.2 Laboratori in cui viene effettuata sperimentazione animale, i controlli

Tutti i laboratori coinvolti nella sperimentazione animale vengono periodicamente ispezionati da diverse autorità quali:

- le Autorità Sanitarie Locali (ASL) con personale veterinario per controllare le condizioni di stabulazione degli animali e con personale medico per verificare le condizioni sanitarie dei lavoratori;
- il Ministero della Sanità con i responsabili del servizio veterinario per valutare le condizioni del benessere animale;
- i Vigili del Fuoco e la Guardia di Finanza per verificare l'adempimento alle normative anti-incendio e controllare la gestione amministrativa.

Inoltre:

- i laboratori che eseguono studi tossicologici a scopo registrativo in accordo alle linee guida internazionali quali UE, EMA, FDA o EPA (studi eseguiti secondo le buone pratiche di laboratorio o GLP) vengono ispezionati dal Ministero della Sanità con i suoi tecnici dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) per verificare gli standard di qualità, incluso l'addestramento del personale coinvolto negli studi;
- i laboratori che eseguono, per esempio, il controllo di qualità di farmaci per il rilascio in commercio (studi eseguiti secondo le buone pratiche di fabbricazione o GMP) vengono ispezionati dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) per verificare gli standard di qualità, incluso l'addestramento del personale coinvolto negli studi;
- i laboratori che detengono sostanze stupefacenti vengono ispezionati dai nuclei anti sofisticazione (NAS) dei carabinieri per verificare il corretto uso di tali sostanze;
- all'interno di molti laboratori di ricerca i protocolli sperimentali vengono analizzati ed autorizzati da un comitato di esperti che valutano dal punto di vista etico e scientifico la necessità dell'uso degli animali e le procedure previste.

2.3 Fase preliminare della ricerca non-clinica: dati *in silico* e *in vitro*

I tests *in silico* (computerizzati) consentono attraverso una banca dati informatica di ottenere informazioni sul potenziale meccanismo d'azione e tossicità dei prodotti. Questo tipo di indagini si presenta come estremamente interessante e con molte potenzialità di sviluppo, anche se l'ambito delle applicazioni esclude i prodotti biologici e rimane confinato a molecole di sintesi chimica³.

I tests *in vitro* si effettuano su cellule isolate e tessuti ricostituiti o espantati e contribuiscono a valutare la tossicità diretta sulla cellula e sul DNA (mutagenicità), aiutando a predire il potenziale cancerogeno di una molecola. Possono inoltre essere usati per evitare che sostanze con un notevole potenziale tossico, corrosivo o irritante vengano direttamente saggiate su animali; il loro uso è quindi sempre più diffuso per valutare, almeno in una fase iniziale, la tossicità locale, come la tossicità cutanea, oculare o la fototossicità. Per i test di mutagenesi si usano colture di batteri (test di Ames) o di cellule di mammifero, mentre per valutare la corrosività e la tossicità locale si usano espianti di pelle umana (Episkin o EpiDerm) o cornee di bovino (test BCOP) o di pollo (test ICE) provenienti da animali appena macellati per uso alimentare.

Tali test permettono di evidenziare sostanze con un meccanismo diretto e potente e quindi evitare inutili sofferenze ad animali di laboratorio, ma trattandosi di sistemi che mancano della complessa rete di interazioni che si verificano all'interno di un essere vivente e dovute alle interazioni tra molteplici sistemi e organi, sono test poco predittivi per gli effetti sistemici che si possono evidenziare nel paziente o nel consumatore dopo esposizioni ripetute⁴.

2.4 Fase centrale della ricerca non-clinica: sperimentazione *in vivo*

2.4.1. Farmaci, farmacologia

In base ai dati teorici (articoli scientifici, simulazioni al computer) ed alle evidenze sperimentali su cellule, una nuova molecola viene identificata come possibile farmaco e viene utilizzata *in vivo* per comprovarne l'efficacia. In questo caso non è possibile seguire degli schemi sperimentali internazionali, ma il disegno dovrà variare da prodotto a prodotto. Numerose prove *in vitro* precedono sempre l'applicazione *in vivo* sia per motivi etici che per motivi economici e di tempistica. Grazie alla completa mappatura del genoma umano si è arrivati negli ultimi anni a identificare il nesso tra malfunzionamenti (congeniti o indotti) di particolari geni e l'insorgenza di specifiche patologie. Per questo motivo circa 30 anni fa sono stati "creati" i primi topi transgenici in cui il gene di interesse viene espresso in modo alterato, per mimare la situazione che si verifica nell'uomo. Oggi questa tipologia di animali da laboratorio rappresenta sicuramente la strada più interessante per studiare molte patologie umane e animali e verificare l'efficacia di nuovi farmaci. Nonostante il grande sforzo nella ricerca di base, come evidenziato già dall'FDA nel 2004⁵, la percentuale di fallimenti di sperimentazioni cliniche a causa di insufficiente efficacia dei nuovi farmaci è estremamente alta, fenomeno che comporta una continua contrazione nella ricerca di base. Una delle cause di questo attrito non è l'inutilità dei modelli animali, come spesso denunciato dagli attivisti contrari alla sperimentazione *in vivo*, quanto invece la scarsa disponibilità di modelli predittivi. La sperimentazione farmacologica non deve quindi essere eliminata, ma al contrario è necessario un maggiore sforzo per creare modelli sperimentali più predittivi; infatti in molti casi si è arrivati alla scoperta di farmaci preziosi grazie alla disponibilità di modelli animali adeguati allo studio e cura delle patologie correlate⁶. Laddove, come alcuni tipi di tumori, la

sperimentazione in modelli animali non è possibile o assai difficile, la soluzione è più lontana.

2.4.2. Farmaci, tossicologia

Una volta comprovata l'efficacia, la molecola deve essere sottoposta a test di tossicità applicando la stessa scala gerarchica: dati di letteratura/*in silico*, dati prodotti *in vitro*, prove di tossicità *in vivo*. Gli studi *in vivo* permettono di valutare l'assorbimento, il metabolismo e la distribuzione all'interno dell'organismo del prodotto (farmacocinetica), quali siano gli effetti a breve e lungo termine (tossicità acuta e cronica) e quali gli effetti sulla fertilità e sulle generazioni future (tossicità della riproduzione). Si definisce inoltre per i farmaci quale sia una dose ragionevolmente sicura con cui trattare i volontari sani o pazienti. Il piano di sviluppo tossicologico rappresenta una rilevante causa di attrito nello sviluppo di un farmaco, poiché l'identificazione di eventuali rischi determina la necessità di importanti decisioni aziendali riguardo alla successiva sperimentazione sull'uomo, soprattutto quando si temono rischi superiori al beneficio atteso. Grazie alla notevole standardizzazione dei protocolli e dei metodi, la tossicologia preclinica ha permesso di limitare moltissimo i gravi effetti collaterali alla prima esposizione nell'uomo⁷. Questo è da attribuirsi anche all'uso di due specie di mammifero molto ben conosciute da parte dei tossicologi: in genere un roditore e un non-roditore (es. cane, maiale o scimmia) per meglio prevedere quali possano essere gli effetti in una terza specie (l'uomo). Tale necessità si è evidenziata negli anni '60 dopo il disastro che la Talidomide aveva prodotto sui bambini le cui madri in attesa avevano assunto il farmaco non adeguatamente sperimentato. Grazie ai recenti progressi tecnologici è stato possibile ridurre il numero degli animali e la durata degli studi di tossicità, seguendo con strumenti più efficaci, precoci e sensibili, il decorso degli effetti del farmaco in esame. Si è arrivati dunque ad una notevole riduzione e refinement per quei test che richiedono ancora (per legge) l'animale e tra questi ci sono la farmacocinetica, la farmacodinamica, la tossicità sistemica, la tossicità riproduttiva e l'oncogenesi.

Numerose prove *in vitro* precedono sempre l'applicazione *in vivo*, sia per motivi etici, che per motivi economici e di tempistica.

2.4.3. Sostanze chimiche, tossicologia

Anche per le sostanze chimiche la valutazione della tossicità viene effettuata con un approccio gerarchico giungendo alla sperimentazione sull'animale solo dopo aver esaminato i dati di letteratura, i risultati di analisi *in silico* e quelli di prove *in vitro*. Nel caso di sostanze chimiche non si effettuano naturalmente prove

sperimentali sull'uomo, ma solo studi prospettici o di epidemiologia, ed è quindi assai importante individuare quali siano i sistemi di protezione individuale da far adottare agli addetti delle lavorazioni per produzione e uso di sostanze chimiche o ai consumatori per minimizzare i rischi della popolazione. Anche in questo caso sono soprattutto gli effetti delle esposizioni ripetute (tossicità cronica e potenziale di indurre tumori) e gli effetti sulla fertilità e sulla integrità del prodotto del concepimento che ancora necessitano l'uso di modelli animali.

2.5 Metodi alternativi

Quando si parla di metodi alternativi alla sperimentazione animale si intende una larga classe di test che più che alternativi sono complementari alla sperimentazione su animali. Tali saggi includono oltre ai metodi sostitutivi anche i metodi che comportano una riduzione del numero degli animali o un affinamento delle tecniche di sperimentazione, in accordo con il principio delle 3R (reduce, refine, replace).

Nel periodo 1998-2012 sono stati messi a punto circa 60⁸ metodi alternativi poi validati dai diversi comitati internazionali quali ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on Validation of Alternative Methods), ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) e JaCVAM (Japanese Center for Validation of Alternative Methods) e successivamente recepiti dalle autorità regolatorie internazionali. Molti di questi test hanno portato ad una significativa riduzione e/o affinamento dei test sugli animali e sono applicabili soprattutto nel settore del controllo qualità dei farmaci, ma anche in parte al settore dei controlli di sicurezza dei farmaci e delle sostanze chimiche; altri test hanno permesso la completa sostituzione degli animali con test *in vitro* tesi soprattutto alla valutazione degli effetti locali (es. test di irritazione dermale o oculare).

2.6 Bibliografia

(1) Decreto legislativo n. 116 del 27/01/1992 "Attuazione della direttiva (CEE) n. 609/86 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici".

(2) DIRETTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 settembre 2010 "Sulla Protezione degli Animali Utilizzati a Fini Scientifici".

(3) Hartung T. and Hoffmann S. "Food for Thought... on *in silico* Methods in Toxicology" *Altex* 26, 155-166 2009.

(4) Hartung T., Blaauboer B., Leist M. "Sull'insegnamento dei metodi alternativi in tossicologia".

(5) FDA Marzo 2004: "Challenge and Opportunity on

the Critical Path to New Medical Products".

(6) Garattini S. "Farmacologia E Sperimentazione Animale" *Enciclopedia del Novecento II Supplemento Treccani .it* 1998.

(7) Lovell-Badge R. "Nine out of ten statistics are taken out of context" *Published by Understanding Animal Research - Hodgkin Huxley House, 30 Farringdon Lane, London, 23 Jan 2013.*

(8) ICCVAM website: *U.S. and International Acceptance of Alternative Methods 1998-2012.*

3. Conclusioni

Come recita la direttiva europea 2010/63, "benché sia auspicabile sostituire nelle procedure l'uso di animali vivi con altri metodi che non ne prevedano l'uso, l'impiego di animali vivi continua ad essere necessario per tutelare la salute umana e animale e l'ambiente".

La comunità scientifica è impegnata nella ricerca di test validi che permettano la limitazione dell'uso di animali fornendo uno strumento utile per prevedere efficacia e sicurezza per l'uomo. Molto spesso i test alternativi sono in realtà saggi preliminari o complementari alla necessaria sperimentazione su modelli animali. Nell'ambito della ricerca biomedica, gli animali rappresentano un modello e il loro apporto alla conoscenza e previsione di quanto succederà nella pratica clinica, pur avendo dei limiti, è al momento ancora indispensabile ed insostituibile per assicurare la produzione di nuovi prodotti efficaci e sicuri. In Italia la sperimentazione animale è già sottoposta a severi controlli e, con gli scarsi strumenti attualmente disponibili in termini di test alternativi convalidati, porre restrizioni all'applicazione della normativa Europea non porterebbe ad alcuna riduzione di utilizzo di animali, ma sposterebbe la ricerca verso altri Paesi, soprattutto extra-europei, dove spesso l'uso degli animali è meno controllato e quindi gli studi sono più economici magari a scapito del benessere animale, senza considerare la perdita di "know-how" tra gli addetti alla ricerca in Italia. Ugualmente in campo non terapeutico, c'è la necessità, imposta anche dalla attuale regolamentazione REACH riguardante tutte le sostanze chimiche, dal Regolamento sulla registrazione europea dei fitofarmaci, dal recentissimo regolamento sui prodotti cosmetici, di avere informazioni su eventi avversi o tossici non identificabili solo con modelli alternativi o complementari *in vitro*. Continuare a perseguire irrazionalmente le strade del non uso della sperimentazione animale "ad ogni costo" porterebbe solo

I metodi alternativi includono metodi sostitutivi e metodi che comportano una riduzione del numero degli animali o un affinamento delle tecniche di sperimentazione.

Continuare a perseguire irrazionalmente le strade del non uso della sperimentazione animale "ad ogni costo" porterebbe solo l'Italia in una zona di oscurantismo scientifico.

l'Italia in una zona di oscurantismo scientifico. Gli studi sugli animali continuerebbero invece ad essere condotti (all'estero) in quanto richiesti per legge per l'immissione in commercio di nuovi prodotti, perché la non esecuzione di tali test potrebbe riflettersi in gravi danni sulla salute umana. È necessario perciò che le Società scientifiche, come la Società Italiana di Tossicologia e la Società Italiana di Farmacologia, uniscano a livello scientifico e

mediaticole loro voci allo scopo di guidare le altre Società scientifiche nazionali ed internazionali con interessi affini ad esprimere il loro dissenso scientifico verso un atteggiamento di cieca ortodossia che nega il valore della sperimentazione scientifica fino ad oggi effettuata, fondamentale per la prevenzione della salute umana e per la sua salvaguardia da sostanze tossiche a cui la popolazione è esposta lungo tutto il corso della vita.

Lettera della SITOX alle Autorità

III. On. Beatrice Lorenzin, Ministro della Salute

III. Sen. Emilia Grazia De Biasi, Presidente Commissione Igiene e Sanità

III. On. Pierpaolo Vargiu, Presidente Commissione Affari Sociali

La Commissione XXIV del Senato ha appena approvato l'**art. 9-bis** (Criteri di delega al Governo per il recepimento della Direttiva 2010-63-EU del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici). L'articolo tende a modificare lo spirito e la sostanza della Direttiva EU nel suo processo di recepimento in legge nazionale.

Come Società scientifica ci sentiamo in dovere di comunicare la nostra forte preoccupazione per i punti sotto elencati che, se divenissero legge, comprometterebbero seriamente lo sviluppo della ricerca biomedica e scientifica in Italia, con gravi danni sulla salute e sull'economia del Paese.

Il punto:

1) *Divieto di utilizzare cani, gatti e primati non-umani per la ricerca fondamentale.* Se approvato, questo emendamento comprometterebbe seriamente non solo la ricerca di base, ma anche quella biomedica, in quanto quasi tutte le terapie oggi in uso costituiscono sviluppi applicativi di ricerche fondamentali (*punto c*).

Gli animali rappresentano un modello ed il loro apporto alla conoscenza ed alla previsione di quanto succederà nella pratica clinica, pur avendo dei limiti, è, al momento, ancora indispensabile e insostituibile per assicurare la produzione di nuovi prodotti efficaci e sicuri.

2) *Limitare il riutilizzo degli animali sperimentali a quelli la cui procedura precedente era classificata come "moderata".* Questo punto riguarda quei progetti sperimentali che per riprodurre importanti modelli di patologia umana richiedono un re-intervento sull'animale e la valutazione del livello di sofferenza indotto. Tali procedure sono molto frequenti nella sperimentazione animale e non devono essere impediti da norme speciali (*punto d*).

3) *Vietare gli esperimenti e le procedure che non prevedono anestesia o analgesia, qualora esse comportino dolore all'animale, ad eccezione dei casi di sperimentazione di anestetici o di analgesici.* Questa norma impedirebbe ricerche su moltissimi fronti, in particolare dolore, ictus e, in una applicazione restrittiva, anche quelli di neurofisiologia del comportamento su primati non umani. Inoltre, limiterebbe fortemente gli studi tossicologici (*punto e*).

La presente formulazione dell'articolo non suggerisce il livello di dolore al quale diventa obbligatoria l'anestesia (cosa che invece prevede il testo originale della direttiva). In questo caso anche l'inserimento di un singolo ago, per un prelievo di sangue ad esempio, potendo "comportare dolore" obbligherebbe all'anestesia o all'analgesia preventiva, sottoponendo l'animale a maggiori rischi e ad un maggiore trauma.

Suggeriamo pertanto di inserire le parole "non lieve", così come definito dalla direttiva, dopo la parola "dolore" e la definizione "o altri casi in cui sia scientificamente dimostrato che l'utilizzo dell'anestesia sia incompatibile con lo scopo della procedura" dopo la parola analgesici.

4) *Norme cautelari speciali per l'uso degli animali transgenici.* Tali norme non sono specificate. Ciò che viene specificato in maniera sorprendente è che esse dovranno essere ispirate dall'analisi del rapporto danno-beneficio, del benessere dell'animale e di paventati rischi per l'ambiente e l'uomo. Norme cautelari ispirate da questi principi finirebbero inevitabilmente per limitare la ricerca fondamentale e quella relativa alla causa di molte malattie, poiché non riconoscono il rapporto tra fisiologia e patogenesi. È da sottolineare come per l'uso degli animali transgenici la direttiva europea non preveda alcuna norma speciale, diversa da quelle che si applicano agli altri animali (*punto f*).

5) *Divieto di utilizzo degli animali per xenotrapianti.* Gli xenotrapianti sono fondamentali per terapie innovative e sperimentali volte alla cura di patologie molto gravi, per lo sviluppo e la definizione del profilo di sicurezza di terapie antitumorali personalizzate.

Questo emendamento impedirebbe lo sviluppo di questo tipo di cure ed il loro abbandono metterebbe a serio rischio la salute dell'Uomo (punto g).

Proponiamo quindi che la parte relativa agli xenotrapianti venga eliminata dal testo.

6) *Limitazione delle ricerche sulle sostanze d'abuso.* Le tossicodipendenze, secondo i dati 2012 del Dipartimento Politiche Antidroga, riguardano oltre 2.000.000 di italiani. I meccanismi della dipendenza non sono ancora del tutto chiari, rendendo difficile lo sviluppo di farmaci e terapie adeguate, incluse quelle rivolte alla sindrome di astinenza neonatale che colpisce i nati da madri tossicodipendenti, per il cui trattamento la ricerca sta ottenendo ottimi risultati, proprio grazie ai modelli animali (punto g).

7) *Divieto di creare in Italia allevamenti per cani, gatti e primati non-umani destinati alla ricerca scientifica.* Ciò comporterebbe, sul piano economico, un aumento dei costi d'acquisto e dipendenza dall'estero, su quello scientifico impossibilità e/o estrema difficoltà di fare ricerca sullo sviluppo pre- ed immediatamente post-natale su queste specie.

In Italia la sperimentazione animale è già sottoposta a severi controlli e, con gli scarsi strumenti attualmente disponibili in termini di test alternativi convalidati, porre restrizioni all'applicazione della normativa Europea non porterebbe ad alcuna riduzione di utilizzo di animali, ma sposterebbe la ricerca in altri Paesi, soprattutto extra-europei, dove spesso l'uso di animali è meno controllato e quindi gli studi sono più economici, magari a scapito del benessere animale, senza considerare la politica di "know-how" tra gli addetti alla ricerca in Italia (punto h).

Ugualmente in campo non terapeutico, c'è la necessità, imposta dalla attuale regolamentazione REACH riguardante tutte le sostanze chimiche, dal regolamento sulla registrazione europea dei fitofarmaci, dal recentissimo regolamento sui prodotti cosmetici, di avere informazioni su eventi avversi o tossici non identificabili solo con metodi alternativi o complementari *in vitro*.

L'aspetto comune a tutti questi emendamenti è che essi vanno ben oltre quanto indicato dalla Direttiva EU 63-2010, intaccando così uno dei suoi pilastri fondativi, ovvero l'armonizzazione delle regole nei diversi Stati dell'EU.

Come recita la Direttiva europea 2010/63, "*benché sia auspicabile sostituire nelle procedure l'uso di animali vivi con altri metodi che non ne prevedano l'uso, l'impiego di animali vivi continua ad essere necessario per tutelare la salute umana e animale e l'ambiente*".

Molto spesso i test alternativi sono in realtà saggi preliminari o complementari alla necessaria sperimentazione su modelli animali. Continuare a perseguire irrazionalmente la strada del non uso della sperimentazione animale "ad ogni costo" porterebbe solo l'Italia in procedura di infrazione, scientificamente metterebbe la ricerca italiana fuori dall'Europa.

Gli studi sull'animale continuerebbero invece ad essere condotti (all'estero) in quanto richiesti per legge per l'immissione in commercio di farmaci e nuovi prodotti, perché la non esecuzione di tali test potrebbe riflettersi in gravi danni sulla salute umana. La Società Italiana di Tossicologia esprime quindi il suo dissenso scientifico verso questo atteggiamento oscurantista che nega il valore della sperimentazione scientifica fino ad oggi effettuata, per la prevenzione della salute umana e per la salvaguardia da sostanze tossiche a cui la popolazione può essere esposta lungo il corso della vita.

Grati per l'attenzione che vorrà riservare a questo nostro appello, ci rendiamo disponibili per eventuali chiarimenti.

Con i migliori saluti

Dr. Carlo Locatelli
Presidente SITOX

Consensus Document **Valutazione ragionata del rischio** **dei distruttori endocrini**

Emanuela Testai¹, Corrado L. Galli², Wolfgang Dekant³, Marina Marinovich², Aldert H. Piersma⁴, Richard M. Sharpe⁵

(Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria - Meccanismi

di Tossicità - Viale Regina Elena, 299 - Roma;
²Università degli Studi di Milano, Facoltà di Scienze Farmacologiche - Via Balzaretti 9, Milan-Italy;
³Universität Würzburg, Germany; ⁴National Institute for Public Health and the Environment RIVM, The Netherlands; ⁵The Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, UK)

Negli ultimi anni, in seguito ad evidenze che l'esposizione ad agenti ambientali può condurre a disturbi della funzione endocrina in numerosi

animali selvatici, la comunità scientifica ha espresso preoccupazioni in merito al fatto che simili effetti possano riguardare anche la salute dell'uomo.

Per rispondere a tali preoccupazioni, negli ultimi anni la Commissione europea ha pubblicato il report sullo "Stato dell'arte nella Valutazione dei Distruttori Endocrini" (Kortenkamp et al., 2011), con l'organizzazione di numerosi incontri e workshop sull'argomento, in collaborazione con altre autorità (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo, US EPA, WHO, ecc...), anche al fine di definire chiaramente cosa s'intenda con il termine di distruttore endocrino (ED).

Il documento ha suscitato molti dubbi all'interno della comunità scientifica, sia per gli aspetti scientifici e metodologici, sia in previsione di un'applicazione in campo normativo.

Lo scopo del Position Paper "Rapporto della Task Force della Società Italiana di Tossicologia sui distruttori endocrini Expert Consensus Documents" di Emanuela Testai, Corrado L. Galli, Wolfgang Dekant, Marina Marinovich, Aldert H. Piersma e Richard M. Sharpe è quello di definire un approccio basato sul *weight of evidence* (WoE) per quanto riguarda la valutazione del rischio delle sostanze chimiche che possono agire sul sistema endocrino.

Il manoscritto affronta la definizione di distruttore endocrino (ED) confrontandola con quella di sostanza attiva a livello endocrino (EAS) basandosi sulla modalità d'azione, sulla qualità degli studi che supportano questa ipotesi e sull'affidabilità dell'esistenza di una curva dose-risposta non monotona per questi effetti.

Gli autori hanno enfatizzato come le differenze tra modulazione endocrina e distruzione endocrina debba essere alla base della distinzione tra EAS e ED. Infatti, molti processi adattativi, compensatori e fisiologici, necessari per il corretto funzionamento di un organismo, portano ad alterazioni endocrine misurabili, ed è solo quando questi meccanismi naturali sono influenzati da fattori endogeni e/o esogeni a tal punto che l'organismo non può più compensare che si inducono effetti avversi. Una sostanza per essere definita come ED deve possedere requisiti ben specifici: 1) dimostrare di provocare un effetto avverso in un organismo sano, 2) avere un modo d'azione tipico del distruttore endocrino (plausibilità biologica), 3) deve esserci un nesso di causalità tra l'attività endocrina e l'effetto avverso (forza di associazione). I test tossicologici esistenti non sono generalmente in grado di dimostrare un collegamento causale tra un meccanismo endocrino e un effetto avverso.

Dovrebbe essere dimostrato un rapporto di causa-effetto tra l'attività endocrina e un effetto nocivo per la salute.

Dovrebbero essere valutati tutti gli studi disponibili (positivi o negativi), ma un'attenta valutazione della qualità e dell'affidabilità deve essere fatta al fine di darne il giusto peso nell'approccio WoE.

Un altro punto cruciale evidenziato nel documento è la potenza. Gli estrogeni ambientali sono di diversi ordini di grandezza più deboli rispetto agli ormoni endogeni, quindi l'effetto avverso non può essere presunto o stabilito solo con la valutazione del pericolo, ma dovrebbe essere preso in considerazione un approccio basato sul rischio integrato con informazioni sulla potenza della sostanza chimica, sull'esposizione e sulla suscettibilità della popolazione esposta.

Nel caso degli EDs c'è ancora un forte dibattito sull'ipotesi del "basso dosaggio", secondo il quale gli effetti dei bassi dosaggi, che non sono necessariamente evidenziati nei dosaggi più elevati, possono risultare in una curva dose-risposta non monotona (NMDR).

Ne consegue che per l'individuazione degli ED, prima di utilizzare una procedura di cut-off prevista da varie normative europee basate sull'identificazione del pericolo, è necessario affinare l'analisi della massa dei dati pubblicati presenti nella letteratura scientifica, poiché spesso le informazioni raccolte mancano di una metodologia critica, necessaria per effettuare una valutazione esauriente dei rischi. Infatti, le differenze nella risposta endocrina tra specie sono spesso sottovalutate dal punto di vista della rilevanza nella valutazione di rischio e nei confronti della salute dell'uomo. I risultati ottenuti *in vitro* utilizzando preparazioni di cellule (spesso transfettate) che esprimono diversi recettori ormonali e che non hanno una chiara rilevanza fisiologica correlabile al vivo, per quanto riguarda la farmacocinetica e la biodisponibilità, devono essere considerati come informazioni complementari e non come basi per formulare una valutazione rilevante del rischio per la salute umana.

Gli autori ringraziano la Società Italiana di Tossicologia (SITOX) per aver promosso la fattibilità del position paper "Rapporto della Task Force della Società Italiana di Tossicologia sui distruttori endocrini - Expert Consensus Documents" e la dott. ssa Valentina Galbiati per la traduzione e le modifiche.

Antidotes in Depth 2013

Carolina Prevaldi

(Pronto Soccorso Presidio Ospedaliero di San Donà di Piave (VE), Ulss 10 Veneto Orientale)

Gentilissimi Colleghi, vorrei segnalare a voi tutti un bel congresso al quale ho partecipato: si tratta di "Antidotes in Depth 2013" che si è svolto dal 30 settembre al 2 ottobre a Pavia presso la Fondazione Maugeri, a cura del Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, diretto dal Dr. Carlo Locatelli.

Forse molti pensano che si tratti di un congresso per tossicologi, ma in realtà questo non è del tutto vero. Anche se vi partecipano tossicologi di fama italiani e stranieri, ed anche se gli argomenti sono tossicologici, penso che questo convegno per un medico d'urgenza sia un appuntamento da non mancare. Ormai vi partecipo da qualche anno, su indicazione di colleghi affezionati all'evento, e devo dire che lo trovo sempre più bello, utile ed interessante. Tra gli iscritti vi sono sempre più medici di pronto soccorso, medicina d'urgenza, anestesisti, psichiatri, insomma medici che gravitano nell'urgenza. Questo perché l'argomento è percepito come rilevante per il nostro setting, in continua evoluzione e complesso.

Passare tre giorni a Pavia al congresso di tossicologia penso mi sia stato, anche quest'anno, molto utile. Gli argomenti svolti erano moltissimi,

nuovi ed interessanti. Il livello scientifico alto, il clima molto accogliente e disteso. Ho sentito novità molto importanti per il mio lavoro, ed è stato dato ampio spazio alla discussione. Per farvi solo alcuni esempi nella prima giornata si è fornito un quadro generale della diffusione e tossicità delle nuove sostanze psicotrope e d'abuso. Si è fatto il punto su alcuni miti e false conoscenze in ambito tossicologico, sulle emergenze chimico-tossicologiche e le intossicazioni di massa, le intossicazioni da funghi, da monossido di carbonio. Si è parlato di effetti tossici sul sangue e intossicazioni da metalli rilasciati da protesi ortopediche, argomento nuovo che ha suscitato la curiosità di parecchi partecipanti, di intossicazioni da prodotti domestici nelle nuove formulazioni in commercio, di intossicazioni da neuropsicofarmaci, etc. Tre giornate pienissime.

C'è un altro motivo per aver scritto questa pagina.

Vorrei ringraziare, con questa breve segnalazione, i colleghi del gruppo di Pavia: Valeria, Davide, Sarah, Andrea, ovviamente Carlo e tutto il gruppo, perché, oltre ad aiutarci giorno e notte con le nostre svariate problematiche tossicologiche, hanno l'entusiasmo, la voglia e la forza di creare questi eventi di grande valore scientifico con serietà, onestà e rigore, ma anche con la leggerezza e la simpatia di chi conosce bene ed ama il proprio mestiere.

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 XVI n. 2 - Novembre 2013

Direttore Responsabile Patrizia Hrelia

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

Segreteria Editoriale: Ida Ceserani

CONSIGLIO DIRETTIVO

Presidente: Carlo Locatelli

Presidente eletto: Patrizia Hrelia

Consiglieri: Isabella Andreini, Gioacchino Calapai, Orazio Cantoni, Maura Lodovici, Emanuela Testai, Aurelia Tubaro

Segretario: Corrado Galli

Past President: Marina Marinovich

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