

GIORNALE ITALIANO DI   
TOSSICOLOGIA

Organo ufficiale della Società Italiana di Tossicologia - SITOX



Anno II n. 1 - Aprile 2023



SOCIETÀ ITALIANA DI TOSSICOLOGIA

Riconosciuta con DPR 16/05/1972, n. 376
Iscritta nel Registro delle Persone
Giuridiche della Prefettura di Milano n. 351
pag. 606 vol. II

SEDE LEGALE E OPERATIVA
Via Giovanni Pascoli, 3 - 20129 Milano
02.29520311

segreteria@sitox.org
www.sitox.org

CONSIGLIO DIRETTIVO

PRESIDENTE
Orazio Cantoni

PRESIDENTE ELETTO
Guido Mannaioni

PAST PRESIDENT
Corrado L. Galli

SEGRETARIO
Roberto Russo

CONSIGLIERI
Santa Cirmi
Fabiana Morroni
Valeria M. Petrolini
Emanuela Testai
Luca Tosti
Barbara Viviani

GIORNALE ITALIANO DI TOSSICOLOGIA

DIRETTORE RESPONSABILE
Sarah Vecchio

COMITATO DI REDAZIONE
Salvatore Bianco *Dispositivi Medici*
Luisa Borgia *Bioetica*
Frida Bushati *Comunicazione*
Orazio Cantoni *Tossicologia Cellulare,*
Tossicologia Sperimentale

Claudio Colosio *Tossicologia Occupazionale*
Emanuela Corsini *Interferenti Endocrini,*
Tossicologia Cellulare

Ivano Eberini *New Approach Methodology*
Corrado L. Galli *Tossicologia Sperimentale,*
Emergenze Tossicologiche

Costanza Rovida *Tossicologia Regolatoria*
Marinella Trovato *Sicurezza alimentare*
Sarah Vecchio *Farmaco-Tossicologia Clinica,*
Medicina delle Dipendenze,
Tossicologia di Genere

SEGRETERIA DI REDAZIONE
Ida Ceserani
M. Elena Scamoni

Pubblicazione iscritta nel
Registro della Stampa,
Tribunale di Milano, N. 332 del 31.05.97

IMPAGINAZIONE E STAMPA
RBS Graphic Productions S.r.l. - Torino

Sommario

- _____ **Il rischio e il beneficio**
p. 1 *Sarah Vecchio*
- _____ **Intelligenza artificiale: un uso responsabile ed etico**
p. 2 *Ivana Bartoletti*
- _____ **Analisi del rischio nella valutazione tossicologica**
p. 5 *Corrado L. Galli, Marina Marinovich*
- _____ **Approcci bioinformatici per la valutazione della sicurezza di (nuove) proteine ad uso alimentare**
p. 15 *Ivano Eberini, Antonio Fernandez Dumont, Anna Lanzoni, Luca Palazzolo*
- _____ **Luci e ombre degli integratori alimentari contenenti botanicals: focus sugli aspetti di qualità e sicurezza sulla base dei dati emergenti**
p. 18 *Chiara Di Lorenzo, Martina Cirlini, Valeria Fochi, Gloria Melzi*
- _____ **Differenze biologiche e di genere in tossicologia: quali possibili applicazioni?**
p. 22 *Sarah Allegra, Veronica Cocetta, Silvia De Francia, Patrizia Hrelia, Monica Montopoli*
- _____ **Riflessioni intorno al concetto di rapporto rischio-beneficio nell'addiction e nel suo trattamento**
p. 25 *Sarah Vecchio, Matteo Pacini, Lorenzo Somaini*
- _____ **Effetti dell'alcol sul neurosviluppo: dai meccanismi molecolari alle prospettive terapeutiche**
p. 31 *Luigi Tarani, Elisabetta Gerace, Esi Domi, Valentina Castelli, Guido Mannaioni*
- _____ **Cannabis: uso medico e considerazioni bioetiche per la valutazione del rischio**
p. 35 *Francesca Vagnoni, Massimo Di Muzio, Luisa Borgia*
- _____ **Un breve excursus tra le nanoparticelle: diversa natura, diverso utilizzo e diversi possibili approcci tossicologici**
p. 42 *Valentina Galbiati, Martina Iulini*

È possibile inviare contributi per la pubblicazione sul Giornale Italiano di Tossicologia. I contributi potranno essere inviati direttamente alla Segreteria di Redazione del giornale (SITOX, segreteria@sitox.org) o ai referenti delle aree tematiche.

Il Comitato Editoriale si riserva di valutare tempi e modi per la pubblicazione dei contributi.

Il rischio e il beneficio

Sarah Vecchio

Pericolo, rischio e rapporto rischio-beneficio, una tematica affascinante che riassume alcuni dei principi cardine della Tossicologia, ma che in fondo domina gran parte della nostra vita e delle scelte che ci troviamo a compiere, dalle più banali alle più importanti. Cosa siamo disposti a rischiare per raggiungere il nostro obiettivo? A cosa siamo disposti a rinunciare pur di non rischiare di perdere ciò che abbiamo? Le azioni che conseguono a queste valutazioni non sempre sono quelle che apparirebbero più opportune ad un occhio esterno. La complessità dell'essere umano, del suo pensiero e del suo sentire non trova abbastanza spazio sopra i due piatti della bilancia.

Ma quando gli oggetti dell'analisi sono la salute e la sicurezza, proprio quando il peso della valutazione rischia di essere spostato da timori e allarmismi sull'onda del sensazionalismo o dell'emergenza, è necessario che questi termini siano declinati e interpretati con un imprescindibile rigore scientifico. Spesso tuttavia quelli proposti e maggiormente pubblicizzati sono pareri e commenti di soggetti non idonei o preparati ad esprimerli. La recente pandemia Covid e le misure terapeutiche necessarie al suo contrasto ne sono un esempio.

“Opinioni appunto, e niente altro, valutazioni del rapporto rischio-beneficio fai da te che prescindono da quanto stabilito da agenzie regolatorie nazionali ed interna-

zionali. Confondendo il concetto di pericolo con quello del rischio. Dimenticando l'importanza dell'esposizione. E giungendo a conclusioni aberranti e destituite di ogni fondamento scientifico” (Corrado Galli, Past President SITOX).

Questo numero del Giornale Italiano di Tossicologia riprende il concetto del rapporto rischio-beneficio che è stato al centro del 21° Congresso Nazionale SITOX, con contributi che analizzano e approfondiscono la tematica dalle prospettive più diverse applicandola a settori che spaziano dall'intelligenza artificiale, grazie al contributo di Ivana Bartoletti, esperta di *privacy*, etica e *governance* nel campo dell'Intelligenza Artificiale e delle nuove tecnologie e riconosciuta nel 2019 “Woman of the Year” ai *Cyber Security Awards* a Londra, alla sicurezza alimentare, al campo delle sostanze d'abuso e dell'*addiction*.

Intelligenza artificiale: un uso responsabile ed etico

Ivana Bartoletti

Wipro Technologies e Privacy & Cybersecurity Fellow, Virginia Tech University

INTELLIGENZA ARTIFICIALE: UN USO RESPONSABILE ED ETICO

Il dibattito sull'AI Act è finalmente entrato nel vivo. È un dibattito importante per tutta la società, in particolare in ambito medico, dove sono emersi i benefici e le promesse più interessanti rispetto ai progressi dell'intelligenza artificiale (IA).

Non c'è dubbio che l'IA in ambito medico offra opportunità notevoli, inclusa la capacità di diagnosticare potenzialmente una malattia in uno stadio molto più precoce. Si pensi alla possibilità di esaminare una quantità enorme di immagini per scoprire deviazioni o dettagli altrimenti invisibili all'occhio umano; oppure di sviluppare nuove medicine, o politiche innovative di sanità pubblica, grazie a un supporto predittivo basato su dati storici e territoriali, dunque in grado di supportare una allocazione delle risorse più efficiente.

Tuttavia, non è questa la sede per valutare i benefici dell'IA nel campo tossicologico, dove la ricerca avanza rapidamente. L'obiettivo di questo contributo è presentare una disamina dei rischi connessi all'uso

acritico dell'Intelligenza Artificiale e dei *Big Data*, così da cogliere i benefici senza incorrere in pericoli.

La non neutralità del dato

Il dibattito sugli elementi etici legati all'intelligenza artificiale procede in maniera confusa, come è normale che sia nel caso di tecnologie che, a mano a mano, escono dall'ambito della teoria ed entrano nel mondo reale e dalle conseguenze tangibili.

È successo qualche anno fa nel Regno Unito, con gli esami per gli A-level, che a causa della pandemia vennero cancellati: i voti finali furono quindi surrogati da un algoritmo che poi si scoprì discriminare gli studenti delle scuole statali. Più recentemente, è stato scoperto che l'algoritmo usato da Deliveroo per assegnare i turni di lavoro discriminava a sfavore di chi partecipa ad attività sindacali.

E ancora più recentemente, in un caso che è diventato un monito per l'Europa intera,

una indagine a posteriori ha rilevato che l'algoritmo Syri, usato in Olanda per assegnare sussidi sociali, ha discriminato i cittadini con doppia nazionalità: ben 20.000 famiglie sono state erroneamente private del supporto sociale, con conseguenze disastrose, specie sui più piccoli.

Da una parte siamo bombardati da messaggi che celebrano la potenza sovrumana dei dati - spesso definiti come "petrolio" - la cui analisi produrrebbe risultati obiettivi e quindi dovrebbe sostituirsi alla politica, alle decisioni di sanità o finanza.

D'altro canto, le applicazioni pratiche ci pongono davanti ad una realtà assai diversa: i dati ingeriti acriticamente da un algoritmo, lungi dall'essere obiettivi, rischiano semplicemente di automatizzare e ottimizzare le disuguaglianze attuali, che ovviamente sono riflesse nei dati stessi.

Le origini del *bias*

La manipolazione dei dati tramite algoritmi è oramai realtà quotidiana, ad esempio per il credito, l'*advertisement* personalizzato, l'accesso ai servizi e i sistemi predittivi. La società algoritmica è un modello in cui gli algoritmi hanno una funzione *editoriale* (curando la panoramica di notizie a cui abbiamo accesso), una funzione *creativa* (creando, nel caso degli algoritmi predittivi, i nessi tra passato, presente e futuro) e una funzione di *ingresso* (regolando l'accesso a servizi ed opportunità).

Questi ruoli sono costruiti sul processo di "datificazione" della nostra società, inteso nel senso di trasporre in dati calcolabili tutti i fenomeni che ci circondano, per poi estrarre conclusioni, correlazioni e, talora, causalità.

Potendo già osservare i grandi benefici del progresso tecnologico abilitato dall'IA, siamo d'altronde anche in grado di percepire, e ancor meglio analizzare, i rischi che lo accompagnano.

Dal concedere un credito maggiore all'uo-

mo rispetto che alla donna nella stessa coppia, alla predizione di risultati scolastici migliori per studenti di scuole private rispetto a studenti di scuole statali, la softwarizzazione della discriminazione avviene in maniera oscura e schiva, comportando un rischio rappresentazionale.

I dati utilizzati per il *training* degli algoritmi, per niente neutri, rappresentano la realtà e solidificano le disuguaglianze esistenti. Un algoritmo, privo di un'adeguata riflessione sulla *fairness* e delle appropriate azioni correttive, finirà necessariamente per essere *biased*.

Nel 2019, uno studio rilevò pregiudizi razziali, con molto clamore, in un algoritmo clinico utilizzato da molti ospedali per allocare le cure ai pazienti: la soglia di malessere necessaria per l'erogazione di una stessa cura era più alta per i pazienti neri rispetto a quelli bianchi.

Fin qui

Come è potuto accadere? L'algoritmo era stato addestrato usando i dati sulla **spesa sanitaria passata**; le disparità tra pazienti neri e pazienti bianchi in termini di reddito e di ricchezza di lunga data, presenti ovviamente nei dati storici, hanno così potuto condizionare anche le scelte future.

Sebbene il pregiudizio di questo algoritmo sia stato fortunatamente rilevato e poi corretto, questo incidente solleva un dubbio importante: quanti altri strumenti clinici e medici sono affetti da simili discriminazioni? Uno studio recente ha mostrato che uno strumento di intelligenza artificiale addestrato su immagini mediche, come i raggi X e le scansioni TC, aveva inaspettatamente imparato a distinguere la razza dichiarata dai pazienti, nonostante fosse stato addestrato solo allo scopo di aiutare i medici a diagnosticare le immagini dei pazienti.

La capacità di questa tecnologia di riconoscere la razza dei pazienti, anche quando il medico non è in grado di farlo, può quindi causare abusi e discriminazioni che sono

particolarmente difficili da rilevare e correggere.

Un uso consapevole e responsabile

Specialmente in campo medico, è quindi necessario un uso consapevole e responsabile della IA.

Nessuno dubita che queste tecnologie possano essere notevolmente importanti e di grande sostegno agli operatori medici e sanitari, a patto di rispettare la legge (la normativa della *privacy*, con il suo accento sulla trasparenza, la centralità dell'utente, i suoi diritti informativi, cioè la piena conoscenza di quanto accade alle sue informazioni), ma anche inquadrandosi in una cornice etica e di rispetto dei diritti umani. La normativa europea, attualmente in corso di elaborazione, richiederà che certe applicazioni di IA ad alto rischio siano conformi ad una serie di criteri enumerati nella legge. Probabilmente l'aspetto normativo non sarà sufficiente per costruire la IA in modo responsabile; non c'è dubbio che proprio su questo terreno dobbiamo crescere, e in fretta, in un contesto globale competitivo. Spetta a tutti fare in modo che quella crescita non sacrifichi i diritti fondamentali di persone, pazienti e cittadini.

Analisi del rischio nella valutazione tossicologica

Corrado L. Galli, Marina Marinovich

*Sezione di Tossicologia e Valutazione del Rischio,
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti" (DiSFeB),
Università degli Studi di Milano*

Introduzione

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 valutazione, la quantificazione dell'esposizione e la caratterizzazione del rischio, come anche codificato dall'OMS (FAO/WHO 1985EUD 93/67/EEC of 20.07.1993 e (WHO/UNEP/ILO, ICPS) e a livello EU (Commission Directive 93/67/EEC; Council Regulation (EEC) 793/93; TGD Technical Guidance Document on Risk Assessment, 2003; Commission Regulation (EC) No. 1488/94), sulla base di standard internazionali.

Prima di discutere di identificazione di pericolo, è importante chiarire la differenza tra pericolo e rischio. Il pericolo è una caratteristica intrinseca della sostanza, il ri-

schio è invece la probabilità di andare incontro agli effetti avversi che la sostanza può provocare in seguito all'esposizione al di sopra di una determinata dose denominata soglia. L'identificazione del pericolo riflette l'aspetto qualitativo della valutazione, identificando la potenziale tossicità intrinseca dell'agente chimico, naturale o di sintesi.

- L'identificazione del pericolo consiste nell'identificazione degli effetti avversi (su base qualitativa) prodotti dalla sostanza in esame, quali, ad esempio, neurotossicità, epatotossicità, difetti nei nascituri, ecc., senza tenere in considerazione la dose o la specie nella quale si sono manifestati; è quindi l'identificazione della potenziale tossicità delle sostanze;
- La valutazione 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 do-

vrebbe essere in grado di identificare una dose senza effetto tossico avverso, NO(A)EL (No Observed (Adverse) Level), cioè 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.

- La quantificazione dell'esposizione è parte della valutazione del rischio ed è definita, in accordo con l'Organizzazione Mondiale della Sanità, come la valutazione quantitativa della probabile esposizione ad una sostanza chimica, tenendo in considerazione tutte le fonti rilevanti (alimenti, acqua, aria, ecc.);
- La caratterizzazione del rischio integra le informazioni derivate dalla identificazione del pericolo e dalla valutazione dell'esposizione in un suggerimento utile a fini decisionali e nel gestire il rischio.

Questa è ovviamente una semplificazione di un processo in cui entrano a far parte molti altri elementi quali fattori tossicocinetici (ADME), il meccanismo d'azione, le differenze fra specie e così via.

È, attualmente, l'unica procedura scientificamente accettata a livello internazionale, che può essere usata 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 pericolo, come ad esempio una sostanza chimica sia essa di origine naturale che artificiale.

Identificazione del pericolo

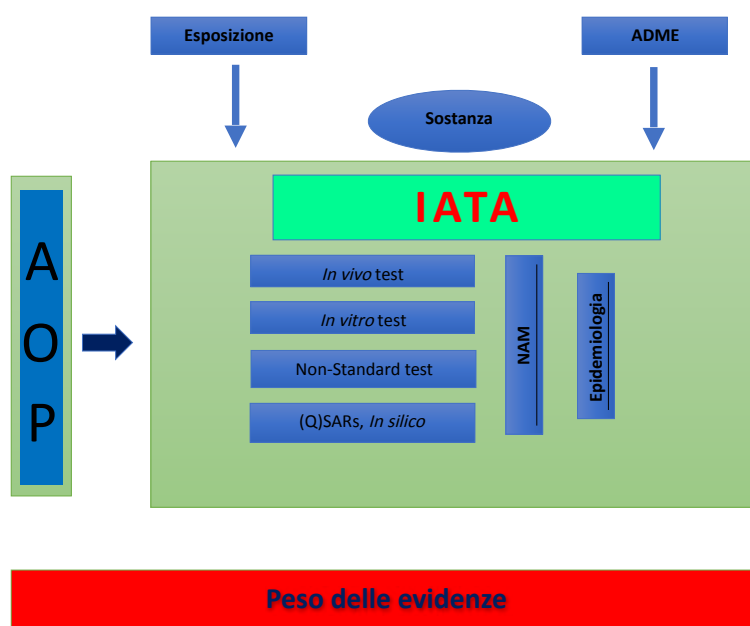
Protocollo sperimentale

La fase di identificazione del pericolo nel XXI secolo si è arricchita di una originale raccolta di prove atte a fornire una sempre più attendibile risposta alla necessità di proteggere la salute della popolazione. L'identificazione degli effetti avversi indot-

ti da una sostanza si basa sulla raccolta ed analisi di una varietà di studi tossicologici che vanno dai modelli *in chemico* (misura delle reattività chimica), *in silico* (misure predittive basate su modelli computazionali), di *read-across* (prevedere le informazioni del bersaglio di tossicità di una sostanza utilizzando i dati di altre sostanze di cui sono note le informazioni riguardanti le proprietà tossiche), *in vitro* (colture cellulari, frazioni subcellulari, enzimi purificati), *in vivo* (animali da laboratorio) e dalle osservazioni sull'uomo (dati epidemiologici e clinici). Questi elementi nell'insieme vengono definiti come Nuovi Approcci Metodologici (NAM). I notevoli progressi nelle biotecnologie, nella microingegneria, microfluidica, informatica, nella potenza di calcolo e nella cooperazione multidisciplinare, hanno consentito lo sviluppo di NAM (Nuovi Approcci Metodologici), inaccessibili solo fino a pochi anni fa. Sebbene si tratti di un campo relativamente nuovo, nato con l'emergere del cambio di paradigma della Tossicologia del XXI secolo, vale a dire la necessità di porre in pratica il principio delle 3R (rimpiazzare, ridurre e (r)affinare) l'uso degli animali con tecniche alternative cioè appunto con Nuovi Approcci Metodologici, i NAM permettono già oggi di studiare le condizioni e le malattie umane in un'ottica *human-based*, cioè incentrata sulla biologia umana ed in condizioni fisiologicamente rilevanti, svolgendo un ruolo importante nella ricerca tossicologica e biomedica. *NAM human-based* permettono, da una parte, lo sviluppo di farmaci e vaccini più sicuri, lo studio dei meccanismi di tossicità e sono efficaci per la specie umana e, dall'altra, il superamento della sperimentazione animale. Alcuni NAM si sono già dimostrati migliori dei modelli animali nel predire le risposte umane. Le informazioni scientifiche così raccolte verranno valutate con un approccio integrato, quale l'*Integrated Approaches to Testing and Assessment* (IATA).

Le risultanze dell'approccio integrato insieme ai dati riguardanti la valutazione del meccanismo di azione, *Adverse Outcome Pathway* (AOP) - un percorso tossicologico tra un evento molecolare iniziale ed "eventi chiave" causalmente collegati che si verificano a diversi livelli dell'organizzazione biologica, fino ad un effetto avverso per l'individuo o per la popolazione -, con l'aggiunta delle informazioni riguardanti le proprietà tossicocinetiche (ADME), genereranno il peso delle evidenze relative a una decisione valutate in base alla loro solidità e qualità. Questo approccio è vantaggioso quando le informazioni provenienti da un singolo elemento di prova da sole non sono sufficienti per dimostrare una plausibile attività biologica. Il peso da attribuire alle prove disponibili dipende da fattori quali la qualità dei dati, la coerenza dei risultati, la natura e la gravità degli effetti e la pertinenza delle informazioni. L'identificazione del pericolo costituito da un agente chimico necessita dell'esecuzione di una complessa batteria di sperimentazioni tossicologiche *in vivo* ancora oggi ritenuti essenziali, al fine di studiare effetti tossici di derivazione complessa quali quelli tumorali, immunologici e relativi alla

riproduzione che necessitano dello 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: la dose letale per via orale per via cutanea (DL_{50}), per via inalatoria (LC_{50}) ed il potenziale irritante cutaneo, oculare e di sensibilizzazione cutanea. Gli effetti genotossici 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 per quattro o tredici settimane in diverse specie ed eventualmente per un anno nel cane. 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 *in vivo* più rilevanti tossicologicamente sono senza dubbio quelle di cancerogenesi e/o di lungo termine compiute somministrando la sostanza in esame, giornalmente, per la maggior parte della vita dell'animale da esperimento utilizzato, cioè circa due anni per i roditori (18 mesi per il topo e 24 mesi per il ratto); 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 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.

Valutazione del pericolo

Dose Giornaliera Ammissibile (DGA o ADI) e NO(A)EL

Per molte sostanze appartenenti a gruppi specifici (residui di pesticidi negli alimenti, contaminanti e additivi alimentari, ecc...) per cui è prevista un'esposizione della popolazione per via orale, è necessario fissare limiti di sicurezza, indicare, cioè, delle soglie prudenziali da non superare.

La valutazione del pericolo viene compiuta applicando una semplice formula

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

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 (Adverse) Effect Level* o Dose a cui non si osserva alcun effetto avverso) la più elevata concentra-

zione 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; secondo una più recente denominazione UF, *uncertainty factor*, fattore di incertezza), 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. Il Fattore di sicurezza può essere ridotto a 10 quando si hanno a disposizione dati derivanti da osservazioni compiute sulla popolazione umana o innalzato a 1000 quando il protocollo sperimentale utilizzato nell'animale ha previsto tempi ridotti (es. trattamento per soli 90 giorni). La maggior parte delle volte al NO(A)EL viene applicato un fattore di incertezza di 100 (10x10), che tiene quindi conto della variabilità di risposta all'interno della popolazione.

La determinazione del NO(A)EL, che ricordiamo è un valore OSSERVATO 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. Vengono usati almeno tre dosaggi, in aggiunta al gruppo controllo non trattato, per determinare la correlazione dose-effetto. Conoscendo la natura della risposta alla dose più alta di una determinata sostanza, si può valutare in modo più sicuro il NO(A)EL ai dosaggi

più bassi concentrandosi più a fondo su particolari organi bersaglio.

Studi a 4 o 13 settimane sono a volte sufficienti per definire il livello di sicurezza, ad esempio con sostanze simili per identità chimica a molecole già approvate per l'uso di cui è nota la bassa tossicità. In questo caso il fattore di sicurezza può essere superiore a 100.

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 veramente dannosi 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 accidentalmente 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. Ancora, una diminuzione ponderale dose-risposta è frequentemente usata per stabilire un livello di effetto in assenza di altre manifestazioni tossiche.

Quando vengono compiuti 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-(adverse)-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.

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, individuate da precedenti risultati sperimentali basati su studi del meccanismo di azione relativamente agli effetti tossici, devono essere preferite 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, 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 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, invece che ad una scarsa gradevolezza al palato della sostanza in esame.

Una volta completata la miglior stima della dose, si valuta il rapporto tra questa dose e l'effetto riscontrato. Per molte caratteristi-

che biologiche (ad esempio tossicità cronica, tossicità su più generazioni) si identificano valori sperimentali di NO(A)EL o di *Lowest Observed Adverse Effect Level* (LOAEL), che vengono poi usati come base per il calcolo dell'ADI.

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, definito come Margine di Esposizione (MoE), rapporto che deve essere superiore a 10.000.

Evoluzione del concetto di ADI

Il concetto di ADI ha subito alcuni perfezionamenti. Il primo è quando viene applicato al campo dei contaminanti, cioè sostanze, per definizione, non aggiunte volontariamente agli alimenti a differenza degli 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, i valutatori del rischio hanno a disposizione limitate informazioni scientifiche utili per una valutazione del pericolo. 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*", introdotto per evitare l'uso di termini pregiudiziali quali sicurezza e accettabile, e promuovere una maggiore consistenza nella valutazione dei composti non cancerogeni, e mantenere una certa separazione fra valutazione e gestione del rischio. Di nuovo, il cambiamento della terminologia non cambia la metodologia. Il NOEL (*no-observed effect level*) diventa NOAEL (*no-observed adverse effect level*), il fattore di sicurezza diventa fattore di incertezza (UF, *uncertainty factor*), l'ADI è stata rimpiazzata con la dose di riferimento (RfD).

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 tossicologici, che ritengono l'ADI una stima relativamente grossolana di un livello di esposizione cronica che ha una elevata probabilità di non causare effetti avversi/tossici nell'uomo. I valutatori del rischio ritengono l'ADI una stima "morbida" i cui margini di incertezza possono allargarsi fino ad un ordine di grandezza.

Quando è stata creata nel 1954 l'ADI dalla FDA accettabile significava accettabile; l'esposizione ad un alimento che conteneva un additivo al di sopra dell'ADI era inaccettabile secondo una definizione legale. Trent'anni dopo, l'ADI, o il suo equivalente RfD, è diventato una definizione di probabilità con un ordine di grandezza di incertezza.

L'approccio Benchmark Dose

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

- l'identificazione del NOAEL è spesso controversa;

- esperimenti con bassa attività biologica danno NOAELs più alti;
- la curva dose-risposta gioca un ruolo modesto nel determinare il NOAEL;
- il NOAEL è limitato alle dosi valutate.

Per superare queste limitazioni sono stati sviluppati metodi che consentono l'impiego di tutti i valori della curva dose-risposta. L'approccio *benchmark* (BM), per esempio, designa una determinata dose, che corrisponde al limite inferiore di confidenza al 95% di un certo aumento (*Benchmark Response* (BMR) generalmente 5%, o 10%) al di sopra del valore di fondo (la dose di riferimento, *benchmark dose*, BMD), sulla base del 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 ($BMDL_{10}$) è paragonabile al LOAEL, mentre quella derivata, sulla base di un rischio aumentato al 5% $BMDL_5$, corrisponde al NOAEL. Analisi più recenti dei dati disponibili, tuttavia, indicano che il $BMDL_{10}$ è vicino al NOAEL. L'utilizzo di questo approccio ha diversi vantaggi: non coincide necessariamente con una delle dosi selezionate sperimentalmente (e quindi può essere utilizzato qualora non si sia riusciti a identificare un NOAEL) e può essere adattato alle dimensioni del campione e alle incertezze ad esso associate.

Valutazione del pericolo cancerogeno

Scelta dell'approccio

In accordo con le linee guida proposte da EPA (U.S. EPA, 1996a) per la valutazione del rischio cancerogeno, il metodo usato per caratterizzare e quantificare il rischio di cancro costituito da una sostanza chimica dipende da ciò che si sa circa il modo d'azione cancerogeno e dalla pendenza della curva dose-risposta

Il fenomeno cancerogeno non lineare è riconosciuto avere una soglia quando è

secondario alla tossicità (cancerogeni epigenetici) che di per se stessa è un fenomeno con soglia e dipende strettamente dal modo d'azione. È, per esempio, il caso dell'effetto cancerogeno di alcuni metalli che è mediato a dosi elevate (soglia) dalla produzione di prodotti reattivi dell'ossigeno o dell'azoto (ROS/RNS).

L'assunzione presunta di linearità del meccanismo di azione dei cancerogeni "iniziato" da un effetto genotossico è accreditata da un punto di vista regolatorio dai gestori del rischio quando l'evidenza supporta che la mutazione genica sia il risultato della reattività lineare della sostanza con il DNA, o altre modalità ove non si possa escludere linearità d'azione (cioè a qualsiasi dose si ammette una attività).

Se il modo d'azione non è noto, l'uso dell'approccio lineare è una questione di metodo strategico cautelativo non basato però su evidenze scientifiche.

Quantificazione del rischio di cancro

Le linee guida per la valutazione del rischio cancerogeno descrivono due metodi alternativi per quantificare il rischio derivante da una sostanza chimica:

Cancerogeno epigenetico (quando le evidenze supportano una modalità di azione non dovuta alla reattività diretta con il DNA):

HQ = dose di esposizione/RfD

HQ (*Hazard Quotient*) = un quoziente di rischio è il rapporto tra l'esposizione potenziale a una sostanza e il livello al quale non sono previsti effetti avversi. Se si calcola che il quoziente di rischio sia inferiore a 1, non sono previsti effetti avversi per la salute come risultato dell'esposizione.

RfD (*Reference Dose*) = si intende la dose (concentrazione) di sostanza tossica per la quale non sono prevedibili effetti avversi per la popolazione umana (compresi sottogruppi sensibili) esposta alla sostanza stessa durante a tutta la vita.

Cancerogeno genotossico (quando le evidenze supportano una modalità di azione dovuta alla reattività diretta con il DNA):

$MoE = PoD/dose$

il margine di esposizione (MoE) è basato su un modello quantitativo che impiega i dati dose-risposta quantificati come Pod o NOAEL/BMDL₁₀ associati con una stima dell'aumento del 10% nei tumori.

Il MoE è calcolato come rapporto del PoD diviso per le dosi di esposizione misurate. Il MoE può essere utilizzato per supportare una certa priorità nella gestione del rischio e, se il MoE è molto ampio, per la comunicazione di un basso livello di preoccupazione per la salute umana. A seconda dell'approccio adottato nell'individuare un PoD è possibile derivare valori molto diversi per il MoE. È quindi essenziale che la selezione dell'*endpoint* del cancro e il trattamento matematico dei dati siano chiaramente descritti e giustificati.

Il comitato scientifico di EFSA ha ritenuto che l'approccio MOE (ref) possa essere applicato alle impurezze che sono sia genotossiche che cancerogene, indipendentemente dalla loro origine. Il comitato scientifico ribadisce l'opinione espressa nel 2005 secondo cui un margine di esposizione di 10.000 o superiore, se basato sul BMDL₁₀ di uno studio sugli animali, e tenendo conto delle incertezze generali nell'interpretazione, sarebbe poco preoccupante da parte di un punto di vista della salute pubblica; l'entità di un MOE, tuttavia, indica solo un livello di preoccupazione e non quantifica il rischio (EFSA 2012).

Una altra valutazione dei cancerogeni genotossici è tramite:

CSF (*Cancer Slope Factor*): il fattore di pendenza del cancro (*Cancer Slope Factor* - CSF) viene utilizzato per stimare il rischio di cancro associato all'esposizione a cancerogeno genotossico. Il CSF definisce

quantitativamente la relazione tra dose e risposta. Poiché il rischio a bassi livelli di esposizione è difficile da misurare mediante esperimenti su animali o studi epidemiologici, lo sviluppo di un CSF comporta generalmente l'applicazione di un modello all'insieme di dati disponibili e l'utilizzo di un modello per estrapolare linearmente dalle dosi relativamente elevate somministrate negli studi su animale ai bassi livelli di esposizione previsti per l'esposizione umana.

Il CSF viene utilizzato per derivare la Dose Specifica di Rischio (*Risk Specific Dose* - RSD) espressa in mg/kg giorno per gli agenti genotossici cancerogeni. L'RSD è spesso calcolato sulla base di un rischio extra su un milione (rischio 10⁻⁶), cioè la probabilità che una persona, su un milione di persone ugualmente esposte, possa contrarre il cancro se esposta continuamente (24 ore al giorno) alla concentrazione specifica per tutta la vita (70 anni). Il termine "extra" nella definizione della RSD si riferisce a un rischio derivante dall'esposizione ambientale alla sostanza chimica in esame rispetto al rischio di fondo che è sempre presente.

Threshold of Toxicological Concern (TTC) o soglia di allarme tossicologico

L'utilizzo dell'approccio pragmatico del TTC, applicabile alle sostanze chimiche senza allerta di genotossicità e non soggette per la loro approvazione ad uno specifico regolamento, è basato sul principio di stabilire una soglia di esposizione umana valida per tutte le sostanze chimiche, al di sotto della quale vi è una probabilità molto bassa del manifestarsi di un rischio apprezzabile per la salute umana. L'approccio TTC mira a selezionare e dare priorità ai composti chimici, presenti in quantità molto piccole, per i quali sono noti i dati sulla struttura chimica e sull'esposizione, ma per i quali i dati sulla tossicità sono limitati o assenti. L'approccio TTC non dovrebbe

essere utilizzato per agenti cancerogeni ad alta potenza (ossia composti aflatossina-simili, azossi- o N-nitroso, benzidine e anche idrazine), prodotti chimici inorganici, metalli e organometallici, proteine, steroidi, sostanze chimiche di cui è noto o previsto il bioaccumulo, nanomateriali, sostanze chimiche radioattive e miscele di sostanze chimiche contenenti strutture chimiche sconosciute.

Le soglie proposte per le sostanze senza allerta di genotossicità sono:

- per una sostanza chimica di classe Cramer I (bassa preoccupazione), 1800 µg/persona/giorno corrispondenti a 30 µg/kg pc/giorno;
- per i composti di Classe Cramer III (alta preoccupazione), 90 µg/persona/giorno, corrispondenti a 1,5 µg/kg pc/giorno

Le soglie proposte per le sostanze con allerta genotossica sono:

- 0,15 µg/persona/giorno, corrispondenti a 0,0025 µg/kg pc/giorno.

Quantificazione dell'esposizione umana

La fase finale di tutto il processo è rappresentata dal confronto delle conoscenze accumulate relativamente al processo della caratterizzazione del pericolo con i dati raccolti sull'esposizione umana. È evidente che maggiore è la distanza tra il ADI/TDI/MoE 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 "sforamento" dell'ADI deve essere comunque giudicato con ragionevolezza, poiché si deve costantemente tenere presente che l'ADI/TDI derivano 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/TDI non devono assolutamente essere considerate 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.

Letture consigliate

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 CD, Bolger PM. *The limits of regulatory toxicology. Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Mar 1;243(2):191-7.

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.

Crump, K., 1984. *A new method for determining allowable daily intakes. Fundam. Appl. Tox.* 4, 854-871.

Dourson, M.L., Stara, J.F., 1983. *Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factors. Regul. Pharmacol. Toxicol.* 3, 224-238.

<https://echa.europa.eu/it/>

EFSA 2009 *Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. The EFSA Journal* (2009) 1150, 1-72.

EFSA Scientific Committee, Hardy A, Benford D, Hall-dorsson T, Jeger MJ, Knutsen KH, More S, Mortensen A, Naegeli H, Noteborn H, Ockleford C, Ricci A, Rychen G, Silano V, Solecki R, Turck D, Aerts M, Bodin L, Davis A, Edler L, Gundert-Remy U, Sand S, Slob W, Bottex B, Abrahantes JC, Marques DC, Kass G and Schlatter JR, 2017. *Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. EFSA Journal* 2017;15(1):4658, 41 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4658.

EFSA 2012 *Scientific Committee; Scientific Opinion on the applicability of the Margin of Exposure approach for the safety assessment of impurities which are both genotoxic and carcinogenic in substances added to food/feed. EFSA Journal* 2012;10(3):2578. [5 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2578. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/journal/18314732>

<https://www.epa.gov/>

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.*

<https://www.fda.gov/>

<https://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>

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 (2000). Lead. WHO Food Additive Series 44. World Health Organization, Geneva.

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.

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 Insti. 27, 455-470.*

U.S. Environmental Protection Agency, 1996. Proposed guidelines for carcinogen risk assessment. Federal Register 61(79), 17960-18010.

U.S. EPA. (1996a) Proposed guidelines for carcinogen risk assessment. Federal Register 61(79):17960-18011.

USEPA. (1999) Guidelines for Carcinogenic Risk Assessment. Review Draft. July 1999. US Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum.

World Health Organization (WHO). (1998) Guidelines for drinking-water quality. Second edition. Addendum to volume 2. Health criteria and other supporting information. Chloroform. Geneva: World Health Organization, pp. 255-275.

Approcci bioinformatici per la valutazione della sicurezza di (nuove) proteine ad uso alimentare

Ivano Eberini*, Antonio Fernandez Dumont**, Anna Lanzoni**, Luca Palazzolo*

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

**European Food Safety Authority (EFSA), Parma

Le proteine presenti nel cibo possono determinare effetti avversi nel consumatore, quali reazioni mediate dal sistema immunitario (allergie, celiachia) e tossicità. In Europa, la sicurezza delle proteine dal punto di vista alimentare viene valutata prima dell'autorizzazione all'immissione in commercio. Esempi rilevanti riguardano organismi geneticamente modificati (OGM), enzimi ad uso alimentare e mangimistico, *novel food*, ecc. L'Agenzia europea per la sicurezza alimentare (EFSA) è l'organo preposto a tale valutazione, svolta seguendo le indicazioni del *Codex Alimentarius* e dettagliata in regolamenti settoriali e linee guida europee. L'Agenzia intraprende inoltre iniziative per mettere a punto o validare nuovi approcci nella valutazione della sicurezza alimentare delle proteine, allo scopo di modernizzarla e irrobustirla, possibilmente con nuove tecniche alternative (ad esempio, *in silico* e *in vitro*) e riducendo gli studi su modelli animali. Questo è di particolare rilevanza anche alla luce delle iniziative *Farm to Fork*, nel contesto

del *Green Deal* Europeo, che promuovono l'uso di proteine nuove e alternative a quelle tradizionali di origine animale. La valutazione della sicurezza delle proteine ad uso alimentare sarà centrale nel prossimo futuro, poiché verranno introdotte nuove fonti proteiche alternative a quelle tradizionali di origine animale. Gli strumenti a disposizione per la valutazione delle proteine sono stati definiti sulla base della valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche e necessitano di evolversi e irrobustirsi, alla luce delle nuove conoscenze scientifiche e tecniche. Per questo, il dialogo tra i vari partecipanti alla valutazione della sicurezza delle proteine sarà fondamentale (ad esempio, EFSA, gli stati membri, l'accademia e l'industria) in un'ottica sia europea, sia mondiale. Nell'area delle reazioni avverse dovute al consumo di nuove proteine mediate dal sistema immunitario, attualmente EFSA sta lavorando sia per migliorare la predizione di reazioni avverse, sia per ridurre l'incertezza nell'analisi del rischio.

I progetti principali riguardano la celiachia (reazione non mediata da IgE) e le reazioni allergiche (mediate da IgE). Per quanto riguarda la celiachia, EFSA ha sviluppato un approccio *stepwise* e un software per la predizione di un passaggio chiave nella patogenesi, cioè il legame di peptidi alle molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8 nelle cellule presentanti l'antigene. Nell'area delle reazioni mediate da IgE, EFSA sta sviluppando un metodo di *ranking* dove gli allergeni sono categorizzati in relazione al rischio e alla severità dei sintomi. Per migliorare il peso delle evidenze utilizzate nella valutazione, EFSA propone quindi lo sviluppo di una base dei dati mirata all'uso dell'analisi dei rischi.

EFSA sta lavorando anche nell'area della predizione di effetti tossici avversi associati alle proteine. Le tossine proteiche sono prodotte da piante, animali e batteri quali strumenti di difesa in ambienti ostili e sono associate a vari meccanismi biochimici che possono portare ad effetti avversi in esseri umani e animali. In una prima collaborazione tra EFSA e l'Università degli Studi di Milano è stata messa a punto una *pipeline in silico* per eseguire una ricerca, quanto più completa e integrata possibile, di proteine con potenziali effetti tossici. In questa procedura si sono definiti database di riferimento e procedure basate su chiavi di ricerca accurate e si è deciso di prendere in considerazione soltanto proteine sottoposte a revisione da parte di curatori esperti.

La scelta della stringa "*toxin activity*" si basa su un progetto embrionale già esistente, a cura degli stessi curatori di UniProt, che hanno selezionato le proteine basandosi sui campi di *Gene Ontology* relativi alla funzione molecolare associata ai veleni animali.

Durante la catalogazione delle proteine tossiche, sono state recuperate anche le strutture tridimensionali risolte sperimentalmente, e generati modelli tridimensionali attraverso modellazione per omologia per quelle mancanti. Inoltre, sono state ottenute

informazioni dettagliate sulle famiglie, i domini, i motivi e le firme molecolari delle proteine da specifici database. Tra i principali risultati, oltre ovviamente alla generazione di un database quanto più completo possibile di tossine, vi è la strategia di ricerca basata su database pubblicamente accessibili e curati, che si stanno rivelando fondamentali per la valutazione del rischio di biopolimeri.

Le informazioni sono state utilizzate come base per esplorare nuove strategie di valutazione del rischio per le proteine, basate su metodi predittivi *in silico*. In una nuova collaborazione tra EFSA e l'Università degli Studi di Milano sono in fase di esplorazione le migliori e più accurate strategie di predizione della funzione proteica (con particolare attenzione alla predizione di tossicità), con l'obiettivo principale di identificare una strategia di predizione *in silico* di tossicità. Si guarda con particolare interesse all'eventuale futuro impiego di modelli di intelligenza artificiale utili a gestire tutte le informazioni di sequenza, strutturali e funzionali sulle proteine di interesse, al fine di ottenere un miglioramento dell'accuratezza degli approcci *in silico* per la predizione di attività tossica di proteine.

Si è partiti quindi dagli strumenti che sono stati prodotti e resi disponibili nell'ultimo decennio. Questi strumenti, disponibili su web server o in archivi pubblici, sono basati sia su classici paradigmi della biochimica e bioinformatica, come l'omologia, valutata attraverso la ricerca di similarità di sequenza, sia su modelli iterativi *position-based*, su modelli di Markov nascosti o su concetti di matematica più complessa, come la teoria dei grafi. Sono già disponibili strumenti in grado di predire la tossicità di proteine, ma anche strumenti specifici per alcune famiglie di proteine, come ad esempio le knottine, o ancora strumenti specializzati nella predizione della tossicità di proteine contenute nei veleni animali. Ovviamente, l'accuratezza di questi strumenti dipende sia dal meto-

do utilizzato, sia anche dal campo operativo della predizione. Attualmente la valutazione di questi strumenti è ancora in corso, ma già emerge la necessità, come per la predizione di proteine allergeniche, di avere uno strumento di predizione pubblico e mantenuto nel tempo dalla Commissione europea e dalle agenzie preposte, nell'intento di una valutazione trasparente della sicurezza delle sostanze. Tale strumento di predizione deve inoltre basarsi su database pubblici e curati, al fine di avere sempre a disposizione dati aggiornati e sicuri. Infatti, tra tutti i vari strumenti analizzati, diversi risultano ormai non più aggiornati o non più accessibili, rendendone impossibile un'applicazione continua e omogenea e generando quindi dati, predizioni e valutazioni irriproducibili.

Luci e ombre degli integratori alimentari contenenti botanicals: focus sugli aspetti di qualità e sicurezza sulla base dei dati emergenti

Chiara Di Lorenzo*, Martina Cirlini**, Valeria Fochi***, Gloria Melzi*

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

**Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma

***Dipartimento di Scienze del farmaco, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro"

Negli ultimi decenni si è assistito ad una rapida espansione del mercato degli integratori alimentari; in Italia, le vendite rappresentano circa un quarto di quelle europee, superando i 3 miliardi di euro nel 2022 [1]. Circa il 50% del mercato di tali prodotti è rappresentato dagli integratori contenenti botanicals, termine che, secondo la definizione fornita da EFSA, include piante, parti di esse, funghi e licheni [2]. Gli integratori alimentari rientrano nell'ambito della legislazione alimentare e, secondo la Direttiva Europea 2002/46/EC, sono definiti come "prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare, ma non in via esclusiva, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate" [3]. Secondo i dati del progetto Europeo PlantLIBRA, circa il 20%

della popolazione italiana è un consumatore abituale di integratori alimentari contenenti botanicals [4]. Tra i fattori che hanno contribuito alla notevole diffusione tra i consumatori di tali prodotti si annoverano: 1-la percezione che il "naturale" sia sempre sinonimo di "sicuro;" 2-la convinzione che possano in alcuni casi sostituire le terapie farmacologiche, soprattutto quando esse non sono risolutive; 3-la possibilità di acquisto senza prescrizione medica in numerosi punti vendita quali farmacie, parafarmacie, supermercati e on-line. A ciò si aggiungono problematiche riguardanti: la qualità della materia prima e del prodotto finito; le contaminazioni accidentali; la non omogenea standardizzazione degli estratti; le diverse regolamentazioni in termini di livelli di contaminanti e fitofarmaci (soprattutto per le materie prime provenienti da Paesi terzi); la presenza di principi attivi il cui profilo di sicurezza è ancora oggetto di dibattito; le possibili contraffazioni e adulterazioni, frequenti nell'e-commerce, queste ultime

riguardanti maggiormente alcune categorie di integratori (es. prodotti destinati allo sportivo, per coadiuvare la perdita di peso). Tutti i fattori citati, naturalmente, possono aumentare il rischio di comparsa di reazioni avverse nei consumatori. Il Minisimposio tenutosi in occasione del 21° Congresso Nazionale SITOX ha avuto lo scopo di fornire alcuni spunti di riflessione sulle principali problematiche relative ad alcuni integratori alimentari contenenti botanicals, in alcuni casi anche alla luce di modifiche di preesistenti regolamenti europei o nuove *opinion* fornite da EFSA.

Uno degli argomenti affrontati, presentato dalla Dott.ssa Gloria Melzi, ha riguardato gli aspetti di sicurezza relativi a integratori alimentari contenenti *Aloe* spp. Le diverse specie di *Aloe* sono molto utilizzate nella formulazione di cosmetici, integratori e nell'industria alimentare e degli aromi per via delle proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. Una delle principali componenti del parenchima delle foglie dell'aloè è l'antrachinone aloè-emodina, recentemente riconosciuto come possibile fattore di rischio per lo sviluppo del cancro al colon-retto con attività genotossica dal panel EFSA-ANS 2018. Nel report è stato infatti concluso che "i derivati di idrossiantraceni dovrebbero essere considerati come genotossici [...] e che gli estratti contenenti derivati di idrossiantraceni destano preoccupazione, sebbene persistano incertezze" [5]. Dunque, è stato effettuato uno studio *in vivo* allo scopo di testare il potenziale effetto genotossico di un estratto di *Aloe ferox* e dell'aloè-emodina. Alla luce dei risultati ottenuti in seguito alla somministrazione di questi estratti e alla valutazione tramite comet test è stato possibile dimostrare l'assenza di genotossicità. Questi risultati suggeriscono che i cambiamenti iperplastici osservati in seguito ad una somministrazione prolungata con estratto di foglie di *Aloe ferox* e con aloè-emodina non sono causati da un effetto genotossico delle so-

stanze stesse [6].

Ulteriore tematica, ancora oggetto di molto dibattito, è stata quella presentata dalla Prof.ssa Chiara Di Lorenzo relativa agli integratori a base di riso rosso fermentato, prodotti largamente utilizzati per coadiuvare la riduzione dei livelli di colesterolemia totale ed LDL. Tale effetto è mediato principalmente dalla monacolina K, prodotto del metabolismo secondario dei lieviti (tra cui il *Monascus purpureus*) impiegati per la fermentazione. Nel 2013, EFSA ha dato parere positivo all'*health claim* relativo all'efficacia della monacolina K alla dose giornaliera di 10 mg nel mantenimento dei livelli fisiologici del colesterolo, pur evidenziando la similarità nella struttura chimica della monacolina alla lovastatina, farmaco utilizzato nel trattamento delle ipercolesterolemie. A seguito di una specifica richiesta da parte della Commissione Europea, l'EFSA ha considerato e valutato la sicurezza d'impiego degli integratori a base di riso rosso fermentato; le conclusioni pubblicate nel 2018 nella relativa *opinion* hanno indicato la difficoltà nello stabilire una dose giornaliera sicura per la popolazione generale. In questo contesto, sono stati segnalati diversi eventi avversi, soprattutto a carico dell'apparato muscolo scheletrico ed epatico, ad apporti giornalieri compresi tra i 3 e i 10 mg. Inoltre, nella medesima *opinion* sono state evidenziate ulteriori problematiche relative alla variabilità del titolo di monacolina K nelle preparazioni presenti sul mercato, la presenza negli estratti di altre monacoline e composti non ancora ben caratterizzati che potrebbero avere un effetto sinergico e contribuire al rischio di comparsa di eventi avversi, oltre alla biodisponibilità variabile cui influiscono gli alimenti assunti in concomitanza. Il 2 giugno 2022, il regolamento europeo 2022/860 ha stabilito che l'apporto di monacolina K tramite integratori alimentari non debba superare i 3 mg/die, con particolari avvertenze per le fasce vulnerabili della popolazione. Poiché

numerosi eventi avversi sono stati rilevati anche alla dose di 3 mg/die stabilita dal regolamento europeo [7], e sulla base delle osservazioni di EFSA, è possibile che tale modifica non garantisca la sicurezza del consumatore.

Tali composti, principalmente atropina e scopolamina, sebbene non diano tossicità cronica, provocano diversi disturbi nell'uomo a livello del sistema nervoso centrale come disorientamento, allucinazioni, delirio, fino a provocare la morte; dosi superiori a 10 mg possono risultare fatali per un bambino. Di conseguenza, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha stabilito una dose acuta di riferimento (ARfD) pari a 0.016 µg/kg b.w. [8].

Gli alimenti maggiormente a rischio sono stati individuati dalla Commissione Europea nel 2015: cereali e derivati, grano saraceno, sorgo, miglio, mais e prodotti derivati, prodotti *gluten-free*, integratori alimentari, tè e tisane, ecc., sottolineando una particolare attenzione per gli alimenti considerati "baby food" [9].

Da ciò deriva l'importanza di disporre di metodi analitici sufficientemente sensibili per la loro determinazione nei prodotti alimentari.

Le recenti metodiche analitiche, messe a punto presso l'Università di Parma, basate sull'utilizzo di cromatografia liquida interfacciata a spettrometria di massa (LC-MS, LC-MS/MS), sono state applicate a matrici alimentari quali cereali e derivati, tè, tisane e integratori alimentari contenenti botanicals, rilevando in questi ultimi un livello di contaminazione compreso tra 19±2 e 77±9 µg/kg per atropina e scopolamina; inoltre, dati recenti, riportano infatti la presenza di anisodamina, un alcaloide intermedio nella sintesi della scopolamina, in un integratore alimentare, anche se i livelli di contaminazione riportati sembrano non rappresentare un rischio per il consumatore [10]. Nonostante ciò, data la varietà di composti e la loro potenziale pericolosità, è importan-

te sottolineare la necessità di un costante monitoraggio dei prodotti alimentari considerati maggiormente a rischio di contaminazione.

Un'altra categoria di integratori che sta riscuotendo grande interesse tra i consumatori è quella basata sull'utilizzo di funghi. Tali ingredienti hanno mostrato la capacità di produrre numerosi composti bioattivi, caratterizzati da comprovate proprietà immunomodulatrici, antimicrobiche ed antidiabetiche, oltre che potenzialmente antitumorali.

Una delle maggiori problematiche legate al controllo di qualità e alla sicurezza di questo tipo di integratori è il rischio associato alla presenza di proteine allergeniche estranee, dovute alla presenza di insetti micofagi (es. tropomiosina), come recentemente sottolineato da un parere del Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (CNSA) [11].

Ancora una volta, appare essenziale la disponibilità di metodi analitici per il controllo di qualità di questi prodotti. Gli approcci basati sull'analisi del DNA, già utilizzati per l'autenticazione dei botanicals, rappresentano un potente strumento di identificazione molecolare, soprattutto quando il riconoscimento morfologico dell'ingrediente non è più possibile.

A tal proposito la Dott.ssa Valeria Fochi, dell'Università del Piemonte Orientale, ha presentato un metodo analitico innovativo rapido basato sulla tecnica LAMP per autenticare la presenza di *Grifola frondosa* (Maitake) in integratori alimentari. *G. frondosa* è un prodotto di alto valore commerciale che ha dimostrato possedere β-glucani e glicoproteine con potenziali proprietà immunomodulatorie, antimicrobiche e antidiabetiche. Il metodo sviluppato ha permesso di individuare fino a 0,62 pg di DNA genomico di Maitake in meno di 20 minuti ed è stato in grado di rintracciare un ingrediente non dichiarato in etichetta in un prodotto commerciale. Test di Real time PCR sono stati inoltre effettuati sugli integratori

contenenti ingredienti fungini per individuare tracce di insetto. Su sette integratori analizzati, tre hanno mostrato un segnale di amplificazione PCR positivo, dimostrando la presenza di DNA di insetto all'interno del prodotto.

Questi approcci, in parallelo all'utilizzo di test immunochimici specifici, potrebbero essere utili nel controllo di ingredienti e integratori alimentari, permettendo di scongiurare la comparsa di possibili reazioni avverse di tipo allergico.

In conclusione, le tematiche affrontate, seppur non esaustive, hanno permesso di illustrare alcuni aspetti critici relativi alla sicurezza d'uso degli integratori alimentari, contribuendo, grazie anche alla ricca discussione dei nuovi dati sperimentali, ad un maggiore approfondimento e conoscenza di tali prodotti.

Note

1. [1] Pharmaretail, 2022. <https://www.pharmaretail.it/>
2. [2] EFSA. *Guidance on Safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as ingredients in food supplements*. EFSA J. 2009, 7, 1249.
3. [3] European Commission (2002). *Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002*. Official Journal of the European Communities, (June), 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2010.02.014>.
4. [4] Garcia-Alvarez A, Egan B, de Klein S, Dima L, Maggi FM, Isoniemi M, et al. *Usage of plant food supplements across six European countries: findings from the PlantLIBRA consumer survey*. PLOS One 2014;9:e92265.
5. [5] EFSA Scientific opinion on the Safety of hydroxyanthracene derivatives for use in food, Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) EFSA Journal. 16, 1-97 (2018).
6. [6] Galli CL, Cinelli S, Ciliutti P, Melzi G, Marinovich M. *Aloe-emodin, a hydroxyanthracene derivative, is not genotoxic in an in vivo comet test*. Regul Toxicol Pharmacol. 124:104967 (2021).
7. [7] EFSA Scientific opinion on the safety of monacolins in red yeast rice, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); EFSA Journal, 16(8):e05368 (2018).
8. [8] EFSA Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); EFSA Journal,

11(10):3386 (2013).

9. [9] COMMISSION RECOMMENDATION (EU) 2015/976, *Official Journal of the European Union*, L 157/97 (2015).
10. [10] Cirlini, M., Cappucci, V., Galaverna, G., Dall'Asta, C., Bruni, R. (2019). *A sensitive UH-PLC-ESI-MS/MS method for the determination of tropane alkaloids in herbal teas and extracts*. Food Control, 105, 285-291. ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2019.05.030.
11. [11] Ministero della Salute, CNSA, Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare. *Parere sul rischio legato alla presenza di larve di ditteri non vitali e non visibili ad occhio nudo in funghi conservati* (2019). https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?id=2880.

Differenze biologiche e di genere in tossicologia: quali possibili applicazioni?

*Sarah Allegra**, *Veronica Cocetta***, *Silvia De Francia**,
*Patrizia Hrelia****, *Monica Montopoli***

Università di Torino, **Università di Padova, *Università di Bologna*

DIFFERENZE DI GENERE IN TOSSICOLOGIA: QUALI POSSIBILI APPLICAZIONI?

Il 21° Congresso Nazionale della SITOX, dedicato a “Pericolo, rischio e rapporto rischio-beneficio” e tenutosi a Bologna dal 20 al 22 febbraio, ha indubbiamente affrontato tematiche che riassumono alcuni dei principi cardine della Tossicologia. Ma ha anche saputo dare ampio spazio a relatori e relatrici di tutta Italia, in un susseguirsi di sessioni orali, simposi e poster, contribuendo alla realizzazione di un meeting di grande attualità. Esempio virtuoso è stato il simposio di Tossicologia di Genere, la mattina del 21 febbraio.

Con un buon successo di pubblico, la professoressa Patrizia Hrelia ha aperto i lavori con una *lectio* sullo stato dell'arte in materia di Tossicologia di Genere. Da Bernardine Healy, prima donna, cardiologa statunitense, a sottolineare l'importanza dell'analisi delle differenze di diagnosi e terapia tra uomini e donne in ambito cardiologico, sino ai giorni nostri, con un appello a chi oggi può riscrivere in ogni ambito, con la propria ricerca, un nuovo

approccio alla terapia tenendo conto delle differenze biologiche e di genere.

A moderare le esposizioni delle due giovani relatrici del simposio di Tossicologia di Genere, Monica Montopoli, associata all'Università di Padova, e Silvia De Francia, associata all'Università di Torino.

Veronica Cocetta, assegnista di ricerca presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco a Padova, ha trattato il tema del COVID-19 in ottica di differenze di genere. Lavoro incardinato nel fatto che, fin dall'esordio della pandemia, i dati epidemiologici hanno mostrato che sia la gravità sia la mortalità della malattia da SARS-CoV-2 è risultata più elevata negli uomini rispetto alle donne. L'adozione di una prospettiva informata sul sesso e sul genere nella ricerca si è, infatti, dimostrata efficace nel migliorare l'approccio farmacologico in diverse aree terapeutiche sia negli uomini sia nelle donne. Ed è noto che soggetti maschili e femminili rispondano in modo differente a svariate infezioni virali o

agenti patogeni a causa di una differente modulazione della risposta immunitaria sia innata, sia adattativa. Veronica Cocetta ha inoltre sottolineato che i dati della letteratura suggeriscono un ruolo protettivo degli estrogeni nell'infezione da COVID-19, mediante la regolazione delle citochine correlate all'immunità e all'infiammazione, mentre, al contrario, il testosterone ha effetti principalmente soppressivi sulla funzione immunitaria. A causa di questa disparità di genere, dunque, diverse linee di ricerca hanno ipotizzato che l'uso di terapia ormonale esogena e dei modulatori dei recettori degli ormoni sessuali potrebbe fornire un potenziale terapeutico per i pazienti COVID-19. Uno studio del 2020 ha dimostrato come pazienti con cancro alla prostata in terapia di deprivazione androgenica risultassero parzialmente protetti da infezione da SARS-CoV-2. Studi più recenti hanno confermato il ruolo degli androgeni e del recettore androgenico nel COVID-19, suggerendo come la sensibilità agli androgeni possa essere un fattore importante nella regolazione della severità della malattia. Nell'ottica di validare il coinvolgimento ormonale nella risposta a SARS-CoV-2, la dott.ssa Cocetta ha presentato al simposio uno studio eseguito su donne affette da tumori ovarici e al seno, in terapia con anti-estrogeni. I risultati hanno mostrato una ridotta prevalenza di infezione in pazienti in trattamento con modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni (SERM), ma non in pazienti in trattamento con farmaci che inibiscono la sintesi degli estrogeni. Questi risultati hanno suggerito un ruolo *off-target* dei SERM, che, verosimilmente, comporta un'alterazione del meccanismo di fusione tra virus e cellula, come già osservato in studi su altri virus (MERS-CoV ed Ebola). Il lavoro presentato da Veronica Cocetta può, in sostanza, rappresentare una risorsa pratica in ambito di terapia COVID-19, con un focus ben centrato sulle differenze

biologiche, utile in ambito di Farmacologia di Genere.

Sarah Allegra, invece, assegnista di ricerca presso il Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche dell'Università di Torino, ha trattato il tema del glifosato. Tema discusso a lungo a livello mediatico e che ha prestato il fianco ad approfondimenti anche in sede del simposio. Il glifosato è l'erbicida più diffuso al mondo perché in grado, almeno temporaneamente, di eliminare rapidamente tutta la vegetazione. Trova largo impiego come erbicida nelle colture legnose, orticole e cerealicole, oltre che in ambito industriale, nei campi sportivi e nelle aree gioco per bambini. Tra i derivati del glifosato, il più stabile e abbondante è l'acido amminometilfosfonico (AMPA). Il glifosato è classificato, secondo la Direttiva 67/548/CEE, come irritante pericoloso per l'ambiente con le frasi di rischio R41 e R51/53. Ma, dato il largo impiego, persone, piante e animali possono essere facilmente esposti. A novembre 2017 la Commissione Europea ha concesso un'approvazione quinquennale per gli erbicidi a base di glifosato, con successiva estensione al 15 dicembre 2023. Ad oggi, però, la sicurezza di tale sostanza è ancora in discussione. È stato riportato che le intossicazioni acute dovute alla sua ingestione colpiscono fortemente il sistema cardiovascolare, oltre a causare sintomi gastrointestinali e respiratori, ipotensione e alterazione della coscienza. Alcuni studi *in vitro* su diverse linee cellulari di mammiferi hanno dimostrato che il glifosato è geno, cito e reprotossico. Diversi sono, inoltre, gli effetti sulla fertilità femminile e maschile: il glifosato interagisce con il recettore degli estrogeni α attivando la trascrizione degli elementi reattivi agli estrogeni, alterando l'espressione genica del sistema steroidogenico e, di conseguenza, l'omeostasi ipofisaria, modificando la produzione di LH, FSH, progesterone, estradiolo e testosterone. Inoltre, l'esposizione tra uomo e donna

è profondamente diversa, perché sono state rilevate tracce di glifosato anche negli assorbenti interni. Alla luce di tutte le informazioni ad oggi presenti in materia di glifosato, la Dott.ssa Allegra ha presentato in sede di simposio un metodo rapido, economico e affidabile per determinare la concentrazione di glifosato ed AMPA in campioni biologici. Risulta di fondamentale importanza, infatti, poter determinare con esattezza le concentrazioni di tali sostanze, al fine di poterle correlare con eventuali effetti biologici. La procedura cromatografica presentata è stata sviluppata e validata secondo i criteri UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 e secondo le linee guida EURACHEM. Il protocollo di estrazione è stato testato su plasma umano, farina, miele, acqua. Il metodo presentato da Sarah Allegra può rappresentare una risorsa pratica per applicazioni sperimentali, mediche, di controllo qualità e alimentari, senza dimenticare il diverso ruolo che tali sostanze potrebbero rivestire in ottica di tossicologia di genere.

Dare spazio a voci giovani nella ricerca vuol dire da un lato sostenere negli intenti il lavoro di queste persone, ma anche spendersi per lasciare spazio a nuovi approcci, quale quello *gender-oriented*, impiegabile in modo utile in ambito sia di Farmacologia, sia di Tossicologia di Genere.

Riflessioni intorno al concetto di rapporto rischio-beneficio nell'*addiction* e nel suo trattamento

*Sarah Vecchio**, *Matteo Pacini***, *Lorenzo Somaini**

**Servizio per le Dipendenze ASL BI*

***VP Dole Dual Diagnosis Research Group, Pisa*

La valutazione del rapporto rischio-beneficio nel contesto del trattamento di una patologia è strumento necessario alla tutela della salute ed etico sotto il profilo dell'evidenza scientifica. Tale concetto merita tuttavia alcune riflessioni peculiari se applicato al tema dell'*addiction* e della sua terapia. Innanzitutto sembra ancora necessario ribadire il concetto di *addiction* quale, appunto, malattia, approccio che non può più essere esente dalla massima condivisione e accettazione. Storicamente la dipendenza è stata spesso considerata come un disturbo dell'autocontrollo e della forza di volontà personale, specchio della debolezza di carattere di un individuo propenso alla devianza sociale o all'indugiare nel "piacere", pensiero che è alla base della stigmatizzazione sociale di pazienti, famiglie, operatori e più in generale del sistema di cura. Ampie fasce di popolazione sono ancora convinte che le persone affette da dipendenza siano consumatori incalliti, viziosi dello sbalzo, che non sanno rinunciare alla droga o

non vogliono farlo e che la giusta cura risiede nella forte volontà. In alternativa, per chi sceglie la via della pietà, persone fragili che cercano una falsa soluzione nella droga, per poi rimanerne soggiogati a causa dell'astinenza. Due sentire opposti, errati in maniera equivalente. Fatto ancora più grave è la convinzione che non ci sia alcun trattamento disponibile ed efficace, e che la ricerca in questo campo sia ancora agli inizi. Pensiero diametralmente opposto, ma altrettanto scorretto e pericoloso, è che sia l'illegalità a rendere pericolose le droghe, come a voler tracciare un parallelo tra droga e libertà, spesso confondendo la libertà di assumere droghe con parte dell'effetto di alcune di esse.

Alla luce dei progressi sulla comprensione dei meccanismi neurobiologici che sottendono alla dipendenza e alle sue implicazioni, è ora ampiamente riconosciuto che l'*addiction* è una "malattia medica cronica e curabile che coinvolge interazioni complesse tra i circuiti cerebrali, la genetica,

l'ambiente e le esperienze di vita dell'individuo", in seguito alla quale le persone che ne sono affette "fanno uso di sostanze o mettono in atto comportamenti che diventano compulsivi e spesso continuano nonostante le conseguenze dannose" e per trattare la quale "gli sforzi di prevenzione e gli approcci terapeutici hanno generalmente lo stesso successo di quelli per altre malattie croniche" [ASAM - *American Society of Addiction Medicine, Board of Directors*, 15 settembre 2019]. La stessa Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) riconosce che "la dipendenza (da oppiacei) può essere considerata come una condizione medica, con complessi fattori determinanti di tipo sociologico ed individuale, caratterizzata da una serie di sintomi con implicazioni prognostiche a lungo termine e per le quali oggi esistono opzioni terapeutiche".

L'evidenza scientifica ha ormai ampiamente dimostrato che la dipendenza è una malattia che modifica il comportamento motivato colpendo i circuiti neurobiologici che sottendono al piacere, alla memoria e all'apprendimento, e non una malattia dell'intenzione, che anzi è contraria, per cui agli esordi non è il livello propriamente umano consapevole-intenzionale ad essere intaccato, ma semmai quello animale e istintuale-volitivo. La dipendenza è infatti una malattia possibile anche negli animali. Uno dei più noti ricercatori in questo campo la spiega così: "Ogni sostanza assuefacente usata dalla gente viene anche auto-somministrata dai topi e dalle scimmie. Se noi organizziamo un dispositivo per il quale quando un animale preme una leva gli viene somministrata un'iniezione endovenosa di eroina, quell'animale premerà la leva ripetutamente escludendo altre attività (come cibo, sesso etc) e diventerà dipendente da eroina. Un topo assuefatto all'eroina non sta ribellandosi contro la società, non è vittima di circostanze socio-economiche, non è un prodotto di una famiglia disfunzionale e non è affatto un criminale.

Quel comportamento del topo è semplicemente controllato dall'azione dell'eroina nel suo cervello". Per molti questa visione è riduzionistica, cioè riduce il mondo psichico dell'uomo a quello, peraltro non sondabile, dell'animale. Essa è al contrario la dimostrazione di come la malattia dipendenza non riguardi solo il livello spirituale o superiore del vissuto umano e dell'identità dell'individuo, ma anche e soprattutto la sua struttura di base e il cervello nello specifico, che può ammalarsi come qualsiasi altro organo. Non è quindi sulla spiritualità che si può far leva per guarire la dipendenza, così come non si farebbe leva sull'agonismo per guarire la frattura di un atleta. Se mai il rispetto per l'identità dell'individuo e il culto della realizzazione di sé nelle proprie aspirazioni, valori e progetti può essere un modo per favorire l'applicazione delle cure alla malattia, a salvaguardia dello spirito delle persone malate.

Il rischio, inteso come probabilità che si verifichi un evento avverso, di considerare l'*addiction* altro che una malattia è quello di cercare soluzioni non terapeutiche, ma ideologiche (intese indifferentemente in senso antiproibizionista che proibizionista) e di affidarne la "gestione" (che non avrebbe motivo di essere intesa come processo di diagnosi, cura e riabilitazione) a soggetti non culturalmente e professionalmente preparati e mossi da finalità diverse da quelle curative, con un conseguente incremento e aggravamento delle conseguenze sanitarie e sociali, sia per il singolo cittadino che per l'intera comunità. Esempi agli estremi opposti sono in questo senso le proposte di legalizzazione degli stupefacenti da una parte e la negazione dell'efficacia degli strumenti terapeutici attualmente applicati dall'altra.

Benefici di tale posizione non è possibile individuarne.

Il secondo elemento da considerare è il persistere del concetto di trattamenti "sostitutivi", come se i farmaci prescritti e

somministrati per la cura della dipendenza, in particolare da oppiacei, andassero semplicemente a “rimpiazzare” la sostanza responsabile della patologia mantenendo di fatto il malato nella sua condizione, invece di avere come obiettivo la stabilizzazione del quadro clinico. Si parla nello specifico dei trattamenti con farmaci agonisti oppioidi, quali metadone e buprenorfina, considerati ancora da alcuni “eroina di stato”.

È ormai noto e indiscutibile che la dipendenza consiste nella perdita del controllo sul comportamento di ricerca della sostanza, si stabilisce dopo un periodo di uso e persiste anche se l'uso subisce temporanee interruzioni, a causa di modificazioni neurobiologiche a lungo termine in alcune aree cerebrali che sottendono ai meccanismi del piacere, della memoria e dell'apprendimento. La dipendenza è quindi definibile come malattia recidivante consistente nella perdita del controllo sulla ricerca di una sostanza, con fasi di interruzione del consumo alternate a fasi di ricaduta. A livello terapeutico l'approccio più efficace è quello che produce un controllo automatico sul pensiero e sul comportamento della persona, in modo da estinguere la spinta della sostanza, e gli strumenti che modificano la dipendenza con questo meccanismo si dicono “anticraving”. L'eroina è stata utilizzata in alcuni paesi per soggetti resistenti al trattamento nell'ambito di progetti sperimentali di riduzione del danno, ma non può essere per questo considerata una misura terapeutica. Questa è la differenza tra droghe illegali e farmaci oppiacei legali (metadone e buprenorfina): le droghe producono malattia e la mantengono, i farmaci sono tali perché curano la malattia e mantengono l'equilibrio.

A questa visione “sostitutiva” del trattamento si collega la difficoltà nel considerare la dipendenza come una malattia cronica e la conseguente valorizzazione dei regimi di disintossicazione più che dei trattamenti a lungo termine. Se per altre

malattie croniche (ipertensione, diabete), l'aggravamento del quadro clinico alla sospensione del trattamento è indice dell'efficacia di quel trattamento, che va quindi proseguito, nell'*addiction* la recidiva dopo la sospensione della terapia tende inesplicabilmente ad essere vista come inefficacia della terapia stessa.

Le linee guida OMS riportano al contrario che “fra le opzioni terapeutiche esaminate, il trattamento di mantenimento con agonisti degli oppiacei, associato a trattamenti psicosociali, è stato riconosciuto come il più efficace”, “il trattamento disintossicante mirato all'astinenza (a differenza del trattamento di mantenimento) dà scarsi risultati nel lungo termine” e ancora “per garantire massimi standard di sicurezza ed efficacia dei programmi terapeutici di mantenimento con agonisti, le normative e i regolamenti devono incoraggiare metodiche flessibili di dosaggio, che prevedano basse dosi di partenza e alte dosi di mantenimento, e senza imporre restrizioni sui dosaggi e sulla durata del trattamento”. In sostanza la disintossicazione, intesa come somministrazione della terapia per un breve periodo di tempo, è inefficace nel risolvere la malattia e diventa solo un “intermezzo”, magari benefico ma inconcludente, tra una ricaduta e l'altra.

Trattandosi di malattia cronica recidivante, basata su alterazioni che non recedono a breve-medio termine, la terapia farmacologica deve proseguire a lungo termine per essere efficace. Per la dipendenza da oppiacei la strategia terapeutica che dà i risultati migliori è quella consistente nel mantenimento con metadone e buprenorfina. È noto, infatti, che programmi di disintossicazione a breve e medio termine incrementano le recidive di malattia e la mortalità da *overdose*, fenomeno “elastico” in rapporto all'assuefazione/tolleranza: più si è assuefatti/tolleranti all'eroina, minore è la probabilità di un'*overdose*. Il tossicomane che smette di assumere sostanze, in bre-

ve ritorna pienamente sensibile agli effetti dell'eroina e quindi vulnerabile all'*overdose*, tornando nell'ambiente in cui si era ammalato con un desiderio (*craving*) ancora vivo ed esplosivo e senza strumenti per difendersi. Da anni le ricerche dimostrano che l'*overdose* colpisce soprattutto i soggetti all'uscita dal carcere, dopo l'abbandono di programmi di mantenimento con farmaci agonisti contro il parere dei medici o dopo qualsiasi tipo di disintossicazione anche secondo il parere dei medici. Tutti quei soggetti insomma che si credono, o gli altri credono, "guariti", come se la ricaduta non esistesse, e fosse solo una possibilità per chi se la va a cercare. In Italia si stima che il rischio di morte scenda da 8,9% al 4,1% nel primo anno di cura metadonica, e al 1,9% se la cura procede. Destino ben diverso è il destino dei disintossicati: in uno studio la mortalità totale è del 21,6%, di cui 9,2% per *overdose* in un gruppo di 1730 che si sottopone a disintossicazione con metadone, contro valori di 11,6% e 3,7% per i 1726 che invece seguono una terapia di mantenimento con lo stesso farmaco.

È di solito sottointeso, quando si dice di un farmaco che "funziona", che il funzionamento sia previsto ad una determinata dose e quando venga assunto per un determinato tempo. Così come la febbre non passa se l'antipiretico è somministrato in briciole o una polmonite non guarisce se l'antibiotico viene prescritto ad un quarto della dose efficace per pochi giorni, così gli studi hanno dimostrato che pazienti che non ricevono un trattamento per la dipendenza a dosi adeguate e per la durata necessaria hanno più probabilità di incorrere in recidive di malattia, di svilupparne le complicanze cliniche e di andare incontro ad *overdose* e decesso.

Il rischio di considerare i trattamenti con agonisti oppiacei come inefficaci o addirittura "immorali", o di prevederli esclusivamente in regimi di disintossicazione, è quindi quello di non curare la dipendenza,

lasciare i soggetti privi di strumenti per contrastare la recidiva di malattia dopo interventi di disintossicazione a breve e medio termine, e renderli più vulnerabili al rischio, mortale, dell'*overdose*.

Benefici di tale posizione non è possibile individuarne.

La quarta problematica che è possibile individuare in tema di rapporto rischio-beneficio nel campo dell'*addiction* è la tendenza ad una banale e superficiale generalizzazione del fenomeno della "dipendenza", mettendo in una sorta di unico contenitore tutto ciò che riguarda sostanze e consumatori, oppure al contrario insistendo nel voler distinguere le sostanze in termini di leggerezza e di pesantezza di effetti a breve e lungo termine, inconsapevoli della complessità della materia. Allo stato attuale la patologia da dipendenza si configura come un insieme di quadri clinici estremamente diversificati, a partire dal tipo di sostanza, dai quadri di poliabuso, dalle comorbidità mediche, infettivologiche e psichiatriche associate e dai fattori socio-ambientali che le sottendono. Cambiano le modalità di assunzione, le tipologie di sostanze, le conoscenze sui fattori predisponenti e si modificano gli strumenti diagnostici e terapeutici. Il consumo di eroina avviene, almeno nelle fasi iniziali dell'esposizione, sempre più per via inalatoria e non iniettiva e con il tempo si struttura spesso come poliabuso in associazione alla cocaina, anch'essa fumata sotto forma di crack. Nel tempo abbiamo assistito ad un incremento nella potenza dei derivati della cannabis, con concentrazioni di principio attivo nettamente superiori al passato e quindi in grado di indurre quadri psicopatologici più gravi e frequenti, in particolare se l'esposizione inizia precocemente. Le cosiddette Nuove Sostanze Psicoattive, pur mimando gli effetti delle sostanze più conosciute, lo fanno con una potenza di effetto nettamente superiore e il consumo è gravato dalla difficoltà di intercettazione e di diagnosi dei quadri clinici

associati. Gli strumenti terapeutici si stanno diversificando per essere sempre più compatibili con trattamenti a lungo termine, allo scopo di impattare il meno possibile sulla qualità di vita dei pazienti (formulazioni in compresse, farmaci *long acting*, etc), così come avviene per qualsiasi altra patologia cronica che richiede un'elevata *compliance* del paziente. Il consumo di sostanze legali, quali l'alcol, va contestualizzato e inserito in un dibattito scientifico che non può esimersi dal confronto con la realtà socio-culturale del paese in cui viene portato avanti, consapevoli delle enormi conseguenze sul piano socio-sanitario, soprattutto in alcune fasce di popolazione quale quella adolescenziale. Sempre in questo ambito l'abuso di farmaci da prescrizione (come ansiolitici, antidepressivi e psicoattivi in generale) va monitorato e individuato precocemente, con la stessa dovuta attenzione con la quale si prevengono e si contrastano il misuso e la diversione di altri farmaci. E ancora la ricerca scientifica deve essere sostenuta nello sforzo di individuare trattamenti efficaci per quei quadri che ancora oggi non trovano risposte sufficienti, come la dipendenza da stimolanti.

Il rischio di non applicare tale approccio di complessità alla patologia "addiction" è quello di banalizzare e appiattire le strategie di intervento, dalla prevenzione, al contrasto sociale alle risposte terapeutiche, rendendole non appropriate, inefficienti e inefficaci. Nel tempo i servizi che si occupano di dipendenze hanno fatto, e continuano a fare, lo sforzo di rendersi servizi multispecialistici e multidisciplinari in grado di offrire le migliori competenze e risposte terapeutiche alle differenti problematiche di salute di tutta la popolazione, di quella esposta al consumo così come di quella affetta da quadri strutturati e cronicizzati di *addiction*, anche nonostante i tentativi di collocare tali attività all'interno di contenitori organizzativi non idonei, prescindendo dall'appropriatezza delle cure e dai

diritti alle stesse. I concetti e le strategie di *governance* clinica che sono alla base della gestione di qualsiasi altro ambito sanitario sempre più sono applicati anche al settore delle dipendenze dai professionisti che vi operano, mediante lo studio del *patient journey* dei pazienti, di strategie per migliorare tutte le dimensioni della qualità, di percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali disegnati sulla complessità dei soggetti che vi entrano e degli indicatori necessari alla valutazione dei processi e degli esiti.

Parallelamente la carenza formativa che, a tutt'oggi, persiste nel campo della medicina delle dipendenze, disciplina complessa che attualmente non viene di fatto insegnata durante il corso di Laurea in Medicina e Chirurgia così come durante i percorsi formativi di altre figure professionali, si traduce nel mancato riconoscimento della dignità della disciplina stessa e di conseguenza della patologia, contribuendo inoltre a rendere privo di interlocutori, che siano riconosciuti come idonei e privilegiati, un dibattito sulla materia.

Benefici di tale posizione non è possibile individuarne.

In conclusione, la valutazione del rapporto rischio-beneficio, anche nel campo dell'*addiction* e del suo trattamento, è uno strumento che può essere applicato esclusivamente da tecnici che abbiano concrete e specialistiche competenze nella materia. Qualsiasi altro approccio, ideologico o mosso da interessi di altra natura, sostenuto da chi non ha fatto i conti con il fatto che il cervello può ammalarsi e danneggiarsi anche in modo irreparabile, rischia concretamente di privare pazienti e cittadini degli strumenti necessari a prevenire la malattia e del diritto ad una cura appropriata ed efficace, in assenza di benefici di possibile individuazione.

Bibliografia

The ASAM National Practice Guideline for the Treatment of Opioid Use Disorder: 2020 Focused Update. Adopted by the ASAM Board of Directors December 18, 2019. Disponibile al link <https://www.asam.org/quality-care/clinical-guidelines/national-practice-guideline>, ultimo accesso 25/03/2023.

Linee guida per il trattamento farmacologico e psicosociale della dipendenza da oppiacei. Pubblicato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2009 con il titolo Guidelines for the psychosocially assisted pharmacological treatment of opioid dependence, © World Health Organization 2009.

Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. Lancet Psychiatry. 2016 Aug;3(8):760-773.

Gerra G, Maremmani I, Capovani B, Somaini L, Berterame S, Tomas-Rossello J, Saenz E, Busse A, Kleber H. Long-acting opioid-agonists in the treatment of heroin addiction: why should we call them "substitution"? Subst Use Misuse. 2009;44(5):663-71.

Dole VP, Nyswander ME, Kreek MJ. Narcotic blockade - a medical technique for stopping heroin use by addicts. Trans Assoc Am Physicians. 1966;79:122-36.

Dole VP, Nyswander ME. Rehabilitation of heroin addicts after blockade with methadone. N Y State J Med. 1966 Aug 1;66(15):2011-7.

Dole VP, Nyswander ME. Heroin addiction - a metabolic disease. Arch Intern Med. 1967 Jul;120(1):19-24.

Dole VP, Nyswander ME, Warner A. Successful treatment of 750 criminal addicts. JAMA. 1968 Dec 16;206(12):2708-11.

Newman RG. We'll make them an offer they can't refuse. Proc Natl Conf Methadone Treat. 1973;1:94-100.

Maremmani, I, Pacini, M. Introduzione ai disturbi d'abuso di sostanze: patogenesi e principi di terapia, in Cassano G.B. e Tundo A. (a cura di), Psicopatologia e Clinica Psichiatrica, UTET, Torino, 2006.

Maremmani I., Pacini M. Combating the stigma: discarding the label "substitution treatment" in favour of "behavior-normalization treatment". Heroin Add & Rel Clin Probl 2007; 8(4):5-8.

Maremmani, I, Pacini M, Lubrano S, Cardini, R. Dove sono i pazienti resistenti? Qualità delle terapie e controllo della malattia. Medicina delle Tossicodipendenze (Italian Journal on Addictions), Sett-Dic 2005 anno XIII, numero (48-49).

Pacini M., Maremmani I. Medical meaning of psychosocial issues of heroin addiction. Heroin Add & Rel Clin Probl 2005; 7(2):37-48.

Maremmani I, Pacini M, Lubrano S, Giuntoli G, Lovrencic M. Harm Reduction and Specific Treatments for Heroin Addiction. Different Approaches or Levels of Intervention? An Illness-Centred Perspective. Heroin Addiction and Related Clinical Problems 2002; 4(3):5-11.

Guelfi G. P., Cibirin M., Pani P. P., Maremmani I., For the Board of Directors of Italian Society of Addiction Medicine Can Heroin Maintenance Treatment Be Called a Therapy? Heroin Addiction and Related Clinical Problems 2007; 9(2):5-10.

Effetti dell'alcol sul neurosviluppo: dai meccanismi molecolari alle prospettive terapeutiche

Luigi Tarani*, Elisabetta Gerace**, Esi Domi***,
Valentina Castelli****, Guido Mannaioni*****

*Dipartimento Materno Infantile e Scienze Urologiche, Sapienza Università di Roma,
Centro di Riferimento Regionale di Malattie Rare e Genetica Clinica,
Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico Umberto I

**Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Firenze

***Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, Università di Camerino

****Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata,
Università degli Studi di Palermo

*****Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA),
Università degli Studi di Firenze, SOD Tossicologia Medica e Centro Antiveneni
Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

L'aumento dell'esposizione perinatale a droghe, sostanze di abuso, agenti patogeni o deficit nutrizionali potrebbe spiegare in parte l'elevata prevalenza dei disturbi neuropsichiatrici che si sono verificati negli ultimi decenni. In particolare, il cervello in via di sviluppo è particolarmente vulnerabile all'alcol: bere durante la gravidanza può portare a una serie di disturbi fisici, dell'apprendimento e del comportamento nel neonato e provocare alterazioni molecolari persistenti dei circuiti neuronali clinicamente definiti con il termine sindrome feto-alcolica (*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*; FASD). La FASD è una patologia poco riconosciuta (incidenza globale 0,77%; Lange *et al.*, 2017) che comprende alterazioni dello sviluppo indotte dall'alcol, che persistono nell'età adulta, con meccanismi che non sono ancora completamente chiariti. Durante il 21° Congresso Nazionale della SITOX abbiamo presentato un simposio che ha avuto come obiettivo quello di analizzare gli effetti dell'alcol sul neurosviluppo,

dall'età fetale all'adolescenza, attraverso un'analisi clinica e preclinica, fornendo esempi su come l'alcol possa portare alle alterazioni funzionali e comportamentali, attraverso approcci molecolari, elettrofisiologici e analisi comportamentali, dai meccanismi molecolari alle prospettive terapeutiche.

Il simposio è iniziato con la presentazione del Prof. Luigi Tarani (Pediatra, Genetista e Professore Associato di Pediatria presso la Sapienza Università di Roma) che ha descritto le caratteristiche cliniche della FASD. Questa sindrome eterogenea e complessa si manifesta attraverso una serie di sintomi che comprendono alterazioni fisiche, neurologiche, cognitive e comportamentali (Hoyme HE *et al.*, 2016). Nonostante la FASD rappresenti un'importante causa di ritardo mentale, nella maggior parte dei casi è sotto diagnosticata (Rangmar J *et al.*, 2015), e quando possibile, la diagnosi è generalmente tardiva a causa della sua complessità. Spesso la diagnosi è una diagnosi

di esclusione, perché non esiste attualmente un test genetico o biomolecolare che possa confermare questa patologia. La difficoltà nella diagnosi è legata a motivi relativi a stigma sociali, alla complessità della diagnosi della sindrome stessa, all'interpretazione delle anomalie facciali e alla presenza di particolari caratteristiche che possono manifestarsi anche in altre condizioni patologiche, come il deficit dell'attenzione e iperattività (McLennan JD, 2015). Molti individui affetti da sindrome feto alcolica infatti, sviluppano alterazioni neurologiche lievi, come piccoli deficit nel quoziente intellettivo, dell'attenzione o della memoria, che però non richiamano l'attenzione clinica (Rangmar J *et al.*, 2015, Mattson SN *et al.*, 1997), proprio perché sono difficilmente diagnosticabili e spesso in età avanzata. Visto che non si conosce la soglia del danno teratogeno dell'alcol, si consiglia (impone) la tolleranza zero verso il suo uso in gravidanza. Sfortunatamente, non esiste una cura per la FASD e i meccanismi molecolari alla base di questa patologia sono ancora poco conosciuti.

La seconda presentazione del simposio, esposta dalla Dr.ssa Elisabetta Gerace, (ricercatrice presso il Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università degli Studi di Firenze) ha affrontato proprio questo tema, andando ad analizzare i meccanismi molecolari alterati dall'esposizione all'alcol durante il neurosviluppo in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*. In questi studi, è stato individuato un meccanismo di regolazione della neurotrasmissione dei recettori per il glutammato di tipo AMPA, recettori canale che regolano la neurotrasmissione eccitatoria rapida del sistema nervoso centrale. È stato osservato infatti che l'esposizione cronica all'etanolo induce la produzione di due specifici microRNA (mir-137 e il mir-501-3p) in fettine di ippocampo di ratto che, attraverso un meccanismo di repressione traduzionale di una delle subunità del recettore AMPA (denominata GluA1) andrebbero a

inibire l'espressione del recettore, portando a una riduzione sia dell'espressione proteica che funzionale (risposta elettrica). Questa inibizione è mediata dal recettore metabotropico del glutammato di tipo 5 (mGlu5). Infatti, l'applicazione dell'antagonista selettivo per l'mGlu5 MPEP ha ripristinato sia la over-espressione dei miRNA indotta dall'alcol che i cambiamenti funzionali AMPA-mediati nei neuroni ippocampali della CA1. Queste alterazioni sono state poi validate in un modello murino di esposizione prenatale all'alcol. Esperimenti condotti in topi pre-adolescenti esposti a etanolo durante il primo trimestre di gestazione, hanno mostrato una riduzione significativa della risposta AMPA mediata registrata in ippocampo, associata ad un'alterata espressione delle proteine sinaptiche eccitatorie. Inoltre, questi topi presentano una significativa riduzione della curva di crescita, in accordo con quanto osservato nei bambini FASD. In particolare, i risultati di questo studio suggeriscono che l'esposizione prenatale all'etanolo porta ad una disfunzione della neurotrasmissione eccitatoria, che potrebbe essere responsabile di alterazioni del neurosviluppo e contribuire alla comprensione della patogenesi della FASD. Inoltre, il meccanismo di regolazione, mediato da specifici microRNA (mir-137 e 501-3p) e dai recettori mGlu5, potrebbe indicare due potenziali target di intervento per la terapia di questa patologia.

La terza presentazione del simposio, esposta dalla Dr.ssa Esi Domi (ricercatrice della Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, dell'Università di Camerino), ha mostrato come lo stress vissuto durante il periodo postnatale sia un fattore di rischio nello sviluppo del disturbo da uso di alcol in età adulta. Il modello di stress sperimentale è stato quello della separazione materna dei cuccioli di ratto dalla madre, un modello ben consolidato nel contesto della ricerca preclinica sull'alcol. In particolare,

maschi e femmine di ratti geneticamente selezionati per la loro alta preferenza alcolica, i *Marchigian Sardinian alcohol preferring* (mSP), e ratti Wistar sono stati sottoposti a lievi privazioni sociali ripetute durante la terza settimana dopo la nascita. Gli effetti dell'isolamento sociale precoce (ESI) sono stati poi analizzati a livello del sistema dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, sistema extraipotalamico e sul comportamento di disturbo da alcol in età adulta. Nello specifico sono stati monitorati i livelli di corticosterone, l'espressione genica e proteica dei recettori per i glucocorticoidi (GR) nella corteccia prefrontale (PFC) e l'amigdala (AMG), ed i comportamenti correlati all'alcol dal giorno postnatale 35 (PND35). I risultati hanno mostrato che l'ESI induce una maggiore espressione di GR nella PFC dei ratti mSP maschi e una significativa riduzione dell'espressione di GR nella PFC dei ratti femmina Wistar isolate. A livello dell'AMG, l'isolamento materno non ha indotto cambiamenti di espressione del GR e non ha alterato i livelli di corticosterone. La yohimbina, antagonista dei recettori adrenergici α_2 , utilizzata come fattore di stress farmacologico, ha portato ad un aumento di assunzione di alcol in entrambe le linee di ratto (ratti Wistar e mSP) indipendentemente dall'ESI. Mentre dopo un periodo di estinzione, le femmine di ratto mSP risultano più sensibili agli effetti della ricaduta all'alcol indotta dalla yohimbina. Nel complesso, i risultati di questo studio indicano che l'isolamento sociale precoce, seppur lieve, influenza l'espressione dei recettori GR in maniera dipendente dal ceppo e dal sesso. Una maggiore funzionalità del sistema GR in risposta all'ESI potrebbe conferire invece ai ratti mSP maschi un ruolo protettivo e una risposta adattiva allo stress prevenendo la ricaduta nell'uso di alcol.

La quarta presentazione del simposio, presentata dalla Dr.ssa Valentina Castelli (assegnista di ricerca presso il Dipartimento

di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata dell'Università degli Studi di Palermo) è stata centrata sui recenti dati ottenuti dal gruppo di ricerca in Neuropsicofarmacologia, diretto dalla Prof.ssa Carla Cannizzaro, sull'impatto dell'*alcohol binge drinking* (ABD) sulla reattività emotiva e la risposta allo stress psicosociale in adolescenza. L'*engagement* del *binge drinking* tra gli adolescenti, il modello di bevuta tipico delle regioni del Nord-Europa caratterizzato dal consumo di alcolici fuori pasto in quantità intossicanti, mette a rischio il neurosviluppo di regioni cruciali per il controllo emotivo e strategie di *coping* al contesto socio-culturale. La ricerca finanziata dalla *European Foundation for Alcohol Research*, ha catturato un'istantanea delle abitudini di consumo di alcol e le relative motivazioni, nonché la vulnerabilità a un profilo psicopatologico negli studenti delle scuole superiori del Sud Italia. L'*Alcohol Use Disorder Identification Test - Consumption* (AUDIT-C) ha permesso di rilevare che del totale di 759 studenti intervistati di entrambi i sessi, dai 18 ai 20 anni, l'85% consuma alcol e, tra questi, il 28% è *binge drinker*, con prevalenza simile tra i due sessi. I dati ottenuti dal *Drinking Motives Questionnaire-Revised Short Form* mostrano che l'input verso il *binge drinking* è generato da *Coping drinking motive* - dalla necessità di attenuare le emozioni negative - *Conformity motive* - per evitare il rifiuto sociale - e *Enhancement motive* - dalla necessità di migliorare il proprio umore. Questi dati, i primi del capoluogo Siciliano, confermano che anche nel territorio del mediterraneo con il più forte *core* tradizionale e culturale, il *pattern* di bevuta si sta allineando al modello nordico. Infine, elevato *score* AUDIT-C, indicativo del *pattern* di *binge-drinking*, è predittivo del profilo psicopatologico rilevato mediante il *Millon Clinical Multiaxial Inventory-Third Ed.* Il dato clinico ottenuto non permette di indicare una relazione temporale dell'insorgenza del *pat-*

tern di bevuta *binge* e del profilo psicopatologico, ostacolando l'implementazione di interventi specifici. Pertanto, è stato impiegato il modello animale in cui i ratti maschi adolescenti sono stati esposti all'alcol mediante un paradigma intermittente *binge-like* e testati per un fenotipo vulnerabile alla disregolazione emotiva durante l'astinenza prolungata. Nello specifico, dopo 10 giorni dall'ultima esposizione all'alcol, i ratti sono stati valutati per il comportamento *anxiety-like* nel test di interazione sociale e nel *novelty suppressed feeding test* e per i livelli di resilienza tramite il *forced swimming stress test*. Infine, una coorte separata di ratti maschi adolescenti è stata valutata per la reattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene mediante esposizione al paradigma di stress sociale. I ratti adolescenti esposti al *binge-like* alcol mostrano un elevato *integrated z-score* per l'ansia, indotta dall'interazione sociale e da un contesto ambientale nuovo; una riduzione del numero dei tentativi di fuga nel *forced swimming stress* che suggerisce una ridotta resilienza all'ambiente avverso; livelli di corticosterone basali più elevati, contro una blanda risposta allo stress sociale, rispetto ai rispettivi controlli. Nel complesso, i risultati preclinici suggeriscono che l'ABD in adolescenza induce il verificarsi di una disregolazione emozionale e di un'alterata risposta allo stress, sia da un punto di vista comportamentale che neurobiologico. Questi dati hanno una grande rilevanza traslazionale, poichè forniscono una chiave interpretativa per considerare il *binge drinking* come un fattore di vulnerabilità nell'affrontare le sfide tipiche della giovane età, consolidando la necessità dell'implementazione di strategie di prevenzione e di recupero.

Cannabis: uso medico e considerazioni bioetiche per la valutazione del rischio

Francesca Vagnoni, Massimo Di Muzio*, Luisa Borgia***

**UOC Farmacia e Farmacologia Clinica, Centro Regionale Allestimento Cannabis - IRCCS-INRCA Ancona*

***Presidente Comitato Sammarinese di Bioetica, CDBIO Consiglio d'Europa*

Introduzione

La Cannabis è stata utilizzata per scopi terapeutici per millenni. Nel corso degli anni, sono stati scoperti i suoi principi attivi, i cannabinoidi, con proprietà farmacologiche utili nel trattamento di diverse patologie. Negli ultimi anni, molti Paesi hanno normato l'impiego a fini terapeutici di Cannabis, compresa l'Italia. Tuttavia, l'utilizzo di Cannabis a fini terapeutici presenta anche rischi e sfide che richiedono una attenta valutazione e un regolamento adeguato. In questo articolo si discuterà degli aspetti botanici, chimico-farmaceutici, legislativi, farmacologici, tossicologici e bioetici di valutazione del rischio dell'utilizzo di Cannabis ad uso medico in Italia.

Parole chiave

Cannabis, farmaco-tossicologia, bioetica, gestione del rischio.

Botanica

La Cannabis appartiene alla famiglia delle Cannabaceae e il suo habitat originario è l'Asia centrale acclimatata e coltivata in diversi altri Paesi, dall'Europa all'America. La coltivazione è limitata e ristretta da accordi e normative nazionali e internazionali [1]. È una pianta erbacea, dioica, annuale o perenne, dotata di notevole variabilità morfo/fisiologica, con forme tardive e precoci, diverse anche per aspetto delle foglie e dei semi. Generalmente presenta lunga radice a fittone, fusto ruvido con altezza variabile, dagli 80 centimetri ai tre metri [2].

I fiori maschili (con gli stami) sono riuniti in pannocchie poste alle ascelle delle foglie. I fiori femminili (con i pistilli) sono riuniti in gruppi di 2-6 (infiorescenze) alla base di brattee formanti spighe.

Non è possibile distinguere il sesso della pianta prima della fioritura: generalmente le maschili sono più alte e meno ramificate.

Moderne applicazioni genetiche e impiego di specifici *marker* permettono di discriminare il sesso di una pianta dioica prima della fioritura.

Sia la *Cannabis sativa* sia la *Cannabis indica*, usate ad uso medico, scientificamente non presentano differenze appartenendo alla specie *Cannabis sativa* L [3].

I due termini sono utilizzati per identificare le variabilità tra le varietà di *Cannabis sativa* e *Cannabis indica* principalmente per origini, infiorescenze, tempo di fioritura e effetto farmaco-tossicologico come indicato nella tabella che segue.

Aspetti chimico-farmaceutici

La Cannabis è un fitocomplesso in cui agiscono circa 500 tra cannabinoidi, terpeni, clorofille e alcaloidi, alcuni dei quali presentano attività che non sono ancora chiarite. L'interazione di tutti gli elementi, e non solo l'azione di Δ^9 Tetraidrocannabinolo (THC) e Cannabidiolo (CBD), conferisce alla Cannabis la sua efficacia terapeutica complessiva. Il termine Cannabinoidi fa riferimento a composti a 21 atomi di carbonio. Negli anni '40 furono isolati Canna-

binolo (CBN) e CBD, riuscendo a determinare le caratteristiche strutturali generali di queste sostanze. Il più studiato, anche perché sembra essere il più attivo dal punto di vista psicotropo, è il THC. Ancora non si conoscono gli effetti farmacologici e comportamentali determinati da tutti i Cannabinoidi.

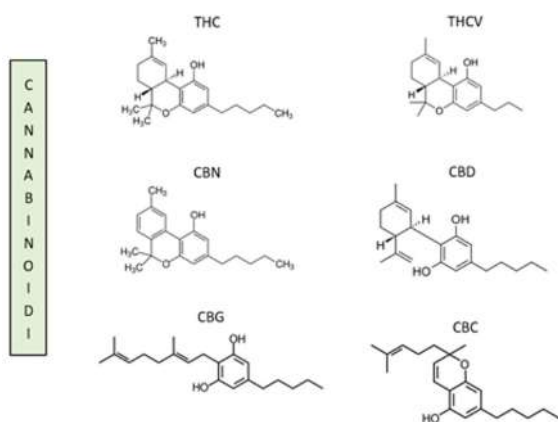
L'esistenza di recettori in grado di riconoscere un cannabinoide sintetico marcato [3H] CP- 55,940 è stata dimostrata nel cervello del ratto. Il legame a questo recettore induceva l'inibizione dell'adenilato ciclasi *in vitro* e attività analgesica *in vivo*. La determinazione del recettore CB1 è stata poi confermata anche nell'uomo. Successivamente è stato identificato un secondo recettore denominato CB2, presente nelle cellule del sistema immunitario.

Le infiorescenze fresche o essiccate "*raw material*" contengono gli acidi cannabinoidici acido tetraidrocannabinolico (THCA) e acido cannabidiolo (CBDA) e non il THC e CBD, che vengono trasformati in questi ultimi prodotti con idonea decarbossilazione (riscaldamento) a 115°C per 40 minuti.

Le caratteristiche chimico-fisiche del THC e CBD sono di essere insolubili in acqua, solubili in rapporto 1:1 in alcol e in acetone, so-

VARIETÀ	ORIGINI	INFIORESCENZE E FIORITURA	EFFETTO
<i>Cannabis indica</i>	Asia centrale e subcontinente indiano (Afghanistan, Pakistan, India del Nord, Tibet, Nepal)	Compatte e robuste, dense, pesanti e fragranti. Tendono a formare ammassi densi intorno ai nodi dei tronchi e dei rami, lasciando spazi liberi (spazi internodali) relativamente ridotti tra un ammasso e l'altro. Fioritura: 45-60 giorni.	L'effetto sembra sottolineare le sensazioni fisiche, (gusto, tatto e l'udito) con effetto di tipo rilassante, a livello sia fisico sia mentale. A dosi più elevate può essere soporifero.
<i>Cannabis sativa</i>	Regioni equatoriali (Tailandia, India del Sud, Giamaica, Messico)	Sono generalmente più grandi della <i>indica</i> . Si sviluppano lungo la lunghezza del ramo, non ammassandosi intorno ai nodi. Una volta essiccate, sono più leggere delle rispettive dell' <i>indica</i> avendo una densità minore. Hanno un odore meno marcato. Fioritura: 60-90 giorni	L'effetto sembra sottolineare sensazioni cerebrali, con effetti energetici. Non causa sonnolenza.

lubili in rapporto di 1:3 in glicerolo e solubili in olii.



Aspetti legislativi

In Italia è in commercio dal 2013 un solo farmaco a base di estratto di *Cannabis sativa* in spray per mucosa orale (SATIVEX®) contenente 27 mg THC e 25 mg di CBD ogni ml, autorizzato per alleviare i sintomi di pazienti adulti affetti da spasticità moderata-grave dovuta alla sclerosi multipla che non hanno manifestato risposta adeguata ad altri medicinali e hanno mostrato un miglioramento.

In Italia, il Decreto del Ministero della Salute del 9 novembre 2015 (GU Serie Generale n. 279 del 30-11-2015) [4] ha disciplinato la produzione nazionale di sostanze e preparazioni di origine vegetale a base di Cannabis. Secondo la legge italiana, è possibile allestire preparati magistrali a base di estratti vegetali di infiorescenze femminili di Cannabis. La Cannabis ad uso medico può essere prescritta da medici autorizzati per il trattamento di alcune patologie, tra cui sclerosi multipla, l'HIV/AIDS, dolore cronico e nausea e vomito associati alla terapia oncologica. Le vie di somministrazione delle preparazioni magistrali a base di Cannabis sono la via orale in forma di tisana (decotto) o estratto oleoso da assumere in gocce per via sublinguale e la via inalatoria tramite vaporizzatore.

Si sottolinea che, non avendo tali preparazioni magistrali a base di Cannabis indi-

cazioni terapeutiche autorizzate, devono essere applicate le disposizioni dei commi 3 e 4 dell'articolo 5 del Decreto legge 17 febbraio 1998, n. 23 [5] (cosiddetta Legge Di Bella) convertito dalla Legge 8 aprile 1998, n. 94. È importante notare che l'uso di Cannabis ad uso medico in Italia è limitato alla prescrizione medica e non è consentito l'auto-trattamento o l'uso ricreativo.

Farmacologia e modalità di impiego

I cannabinoidi sono i principi attivi della Cannabis. Il THC è il principale cannabinoide psicoattivo, responsabile degli effetti "sbalorditivi" della Cannabis. Il CBD è un altro cannabinoide che non ha effetti psicoattivi, ma ha proprietà antinfiammatorie, anticonvulsivanti e ansiolitiche. Altri cannabinoidi presenti nella Cannabis includono il cannabinoide (CBN), il cannabigerolo (CBG) e il cannabichiolol (CBL).

Il meccanismo d'azione mediante il quale i cannabinoidi esercitano i loro effetti comporta il legame ai recettori CB1 e CB2 accoppiati a proteine G in tutto il corpo, stimolando il sistema cannabinoide endogeno, alterando i livelli di endocannabinoidi (eCB) e inibendo il rilascio di neurotrasmettitori come l'acido gamma-aminobutirrico (GABA) e glutammato. I recettori CB1 e CB2 consentono anche altre forme di neuromodulazione, tra cui un aumento del rilascio di dopamina, un ridotto rilascio di acetilcolina e un ridotto rilascio di norepinefrina. Gli eCB sono messaggeri lipidici neuroattivi endogeni che svolgono un ruolo nella ricompensa, nella memoria, apprendimento e vie del dolore. Le più alte concentrazioni di recettori CB1 e CB2 si trovano rispettivamente nel sistema nervoso centrale e nelle cellule immunitarie. I recettori CB1 si trovano principalmente nei terminali nervosi dove svolgono un ruolo nella regolazione retrograda della funzione sinaptica, ma anche nella milza, nel cuore, nei polmoni, nel tratto gastrointestinale, nella vescica e negli organi riproduttori. I CB2 si concentrano

nei tessuti e nelle cellule del sistema immunitario (leucociti e milza), ma anche negli astrociti delle cellule nervose.

Il THC produce effetti su dolore, appetito, digestione, emozioni e processi mentali mediati dal sistema endocannabinoide. Il suo uso è applicabile per molti sintomi e condizioni tra cui: dolore, nausea, spasticità/spasmi, stimolazione dell'appetito, ansia, depressione, disturbo da stress post-traumatico (PTSD) e insonnia. Il CBD ha proprietà anticonvulsivanti, miorilassanti, ansiolitiche, neuroprotettive, antiossidanti e ha dimostrato di ridurre gli effetti ansiogeni e psicoattivi dovuti al THC. Il CBD manca di psicoattività poiché sembra non legarsi ai recettori CB1 né ai CB2, ma influenza l'attività di altri *target* quali canali ionici ed

enzimi con potenziali effetti antidolorifici, anti-nausea, antiemetici, antipsicotico, anti-ischemico, ansiolitico e antiepilettico. Sembra quindi probabile che una combinazione di THC e CBD possa contenere gli effetti collaterali che spesso limitano l'uso del solo THC sintetico o isolato.

Gli effetti avversi acuti e cronici associati all'uso di Cannabis includono tachicardia, ipotensione, paranoia, vertigini, compromissione dello sviluppo cognitivo e delle prestazioni psicomotorie, compromissione dell'attenzione e della memoria, esacerbazione di alcune malattie psichiatriche, lesioni delle vie aeree e malattie polmonari, rischio di dipendenza e dipendenza e riduzione del peso alla nascita, se usato durante la gravidanza [6].

NOME COMMERCIALE	THC	CBD	PREDOMINANZA	PRODUTTORE
Bedrocan	~ 22%	≤ 1%	<i>Sativa</i>	Bedrocan
Bediol	~ 6%	~ 8%	<i>Sativa</i>	Bedrocan ⁸
Bedrobinol	~ 12%	≤ 1%	<i>Sativa</i>	Bedrocan ⁸
Bedica	~ 14%	≤ 1%	<i>Indica</i>	Bedrocan ⁸
Bedrolite	≤ 1%	~ 9%	<i>Sativa</i>	Bedrocan ⁸
FM1	13%-19%	≤ 1%	<i>Sativa</i>	SCFM
FM2	5%-8%	7,5%-12%	<i>Sativa</i>	SCFM ⁹
Pedanos 22:1	~ 22%	≤ 1%	<i>Sativa</i>	Aurora
Pedanos 8:8	~ 8%	~ 8%	<i>Sativa</i>	Aurora ¹⁰

Tipologia di Cannabis per uso medico attualmente disponibili in Italia

Le varietà prescrivibili in Italia sono: Bedrocan, Bediol, Bedrobinol, Bedica, Bedrolite, FM2, FM1, Pedanos 22, Pedanos 1/12, Pedanos 8/8. La differenza fra queste tipologie di Cannabis consiste principalmente nella concentrazione dei due principali cannabinoidi THC e CBD.

Tossicologia

Gli effetti collaterali più comuni della Cannabis sono dovuti al THC: euforia, tachicardia, ipotensione ortostatica, cefalea, vertigini, bruciore e rossore agli occhi, secchezza

delle fauci, debolezza muscolare. Raramente possono manifestarsi crisi paranoiche e di ansia, reazioni psicotiche e sindrome motivazionale (apatia, letargia, peggioramento della memoria e della concentrazione). È sconsigliato il suo uso nei pazienti cardiopatici per il rischio di comparsa di tachicardie. Generalmente dopo alcuni giorni o settimane si sviluppa una tolleranza che permette di aumentare gradualmente la dose. L'uso della Cannabis è generalmente controindicato in caso di gravidanza, allattamento, malattie psicotiche e nei bambini. Il sovradosaggio può determinare depressione o sentimenti di paura e panico, fino alla perdita di conoscenza.

Generalmente, i sintomi scompaiono spontaneamente. L'uso a lungo termine può provocare tossicità respiratoria e cardiovascolare e sindrome da iperemesi da cannabinoidi. L'intensità e la durata dei sintomi è proporzionale alla concentrazione di THC nel sangue.

Dopo l'uso acuto, il THC rimane nel sangue solo per diverse ore prima di essere convertito in un derivato carbossilico del THC che si ripartisce nel grasso, da dove fuoriesce e può essere rilevato nelle urine per settimane dopo l'uso.

L'uso della sostanza vegetale può determinare positività ai test antidoping (Legge 376/2000 [7]), ai controlli previsti dal Codice della strada [8] (Art. 187 del Codice della Strada: Guida in stato di alterazione psico-fisica per uso di sostanze stupefacenti) o alle procedure per gli accertamenti sanitari stabiliti dall'Accordo stato regioni dell'8 settembre 2008 sui lavoratori con mansioni a rischio [9].

Quando s'impiega la Cannabis per uso medico alle dosi terapeutiche raccomandate, solitamente inferiori a quelle per uso ricreativo, e non si utilizzano dosaggi sub-terapeutici, si riduce il rischio di dipendenza complessa. Si ritiene pertanto opportuno che il medico prescrittore valuti attentamente, in ogni soggetto eleggibile al trattamento, il dosaggio appropriato, tenendo conto anche delle problematiche correlabili a un eventuale rischio di dipendenza complessa da Cannabis del soggetto.

A causa dell'elevato effetto di primo passaggio epatico, in particolare nel caso di somministrazione orale, possono verificarsi interazioni farmacocinetiche con farmaci che sono metabolizzati attraverso gli isoenzimi del sistema del citocromo P450. L'uso simultaneo degli inibitori degli enzimi di cui sopra può aumentare la biodisponibilità di THC e con questo la possibilità di effetti indesiderati. Sono descritti effetti sedativi sinergici in seguito alla contemporanea assunzione di sostanze psicotrope come

alcol etilico e farmaci come le benzodiazepine, gli antidepressivi, gli antiepilettici, i barbiturici e gli oppiacei.

Il THC è ossidato dalla famiglia dei citocromi P450 (CYP) 2C9, 2C19, e 3A4. Pertanto, le sostanze che inibiscono questi isoenzimi CYP come alcuni antidepressivi (fluoxetina, fluvoxamina, e nefazodone), gli inibitori della pompa protonica (cimetidina e omeprazolo), i macrolidi (claritromicina ed eritromicina), gli antimicotici (itraconazolo, fluconazolo, ketoconazolo, miconazolo), i calcio antagonisti (diltiazem, verapamil), gli inibitori della proteasi HIV (ritonavir), amidarone e isoniazide possono potenzialmente aumentare la biodisponibilità di THC, nonché la possibilità di manifestare effetti collaterali dello stesso.

D'altra parte, i farmaci che accelerano il metabolismo del THC attraverso gli isoenzimi 2C9 e 3A4 (rifampicina, carbamazepina, fenobarbital, fenitoina, primidone, rifabutina, troglitazone e l'erba di San Giovanni-*Hypericum perforatum L.*) possono, al contrario, ridurre la biodisponibilità del THC e quindi la sua efficacia quando usato in un contesto terapeutico.

THC, CBD e cannabinolo CBN sono noti per inibire gli isoenzimi CYP, come CYP1A1, 1A2 e 1B1. La Cannabis può quindi aumentare la biodisponibilità di farmaci metabolizzati da questi enzimi. Tali farmaci comprendono amitriptilina, fenacetina, teofillina, granisetron, dacarbazina e flutamide.

Segnalazioni di reazioni avverse (fitosorveglianza)

La Cannabis ad uso medico in Italia è soggetta a monitoraggio costante attraverso il sistema di fitosorveglianza, un sistema di sorveglianza e monitoraggio delle reazioni avverse associate all'uso di prodotti fitoterapici tra cui quelli a base di Cannabis. In Italia il sistema di fitosorveglianza è coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità e prevede la raccolta di dati relativi alle segnalazioni di reazioni avverse e alle intol-

leranze a prodotti a base di piante medicinali. Le informazioni raccolte vengono poi utilizzate per monitorare l'incidenza delle reazioni avverse potenzialmente associate al trattamento e definire meglio il profilo di sicurezza.

I pazienti che utilizzano Cannabis ad uso medico devono essere informati sulla possibilità di segnalare eventuali reazioni avverse e sui canali attraverso i quali farlo. La segnalazione può essere effettuata da parte di medici, operatori sanitari o cittadini attraverso il portale online VigiErbe [10].

Valutazione del rischio e implicazioni bioetiche

L'utilizzo di Cannabis ad uso medico solleva alcune questioni bioetiche. Poiché siamo di fronte ad un uso recente di tale sostanza in ambito terapeutico, non vi sono ancora dati sufficienti per effettuare una adeguata valutazione del rapporto rischio/beneficio, elemento fondamentale per l'attuazione del basilare principio bioetico di beneficenza/non maleficenza.

Pertanto, come in tutti i casi di innovazione scientifica che contemplino gradi di incertezza, è necessario basarsi sul principio di precauzione (le misure da adottare devono perseguire concretamente un obiettivo legittimo, rappresentare la soluzione meno invasiva per le persone coinvolte e conseguire un beneficio superiore ai rischi prevedibili) e sul principio di proporzionalità.

La valutazione e la gestione del rischio diventano gli elementi discriminanti non solo per la valutazione bioetica, ma anche per quella medico-legale in merito alle responsabilità, sia degli operatori sanitari, sia dello stesso paziente che assume il preparato.

La prescrizione medica deve basarsi sull'appropriatezza clinica, avendo tuttavia la consapevolezza che c'è ancora una letteratura scientifica limitata in merito e che alcuni utilizzi potrebbero configurarsi come "off label".

Fondamentale è, in questi casi, il rappor-

to medico-paziente basato su un'accurata informazione bidirezionale: non vi deve essere solo una esauriente e comprensibile informazione dal medico al paziente sul trattamento e su possibili opzioni terapeutiche, ma è ineludibile che il paziente informi il medico di ogni farmaco o prodotto (cibo, nutraceutico, erboristico) che assume, nonché sul proprio stile di vita (alcol, tabacco). Ciò al fine non solo di evitare possibili interazioni farmacologiche, ma anche per prevenire possibili abusi o dipendenze della sostanza.

È solo attraverso un quadro completo che si può pervenire a una prescrizione appropriata e che permetta una attenta valutazione e gestione del rischio.

Inoltre, proprio per la carenza di dati a disposizione, è fondamentale la puntuale segnalazione di reazioni avverse sia da parte del paziente, sia da parte del medico, per contribuire ad accrescere la conoscenza di un settore scientifico "in progress".

Analogamente, è necessario informare il paziente sulla conservazione del preparato al riparo da possibili assunzioni accidentali per soggetti minori, incapaci o animali da compagnia.

In merito alle responsabilità professionali, il medico è tenuto a informare esaurientemente il paziente anche sulle differenti proprietà farmacocinetiche che variano in funzione della dose assunta e della modalità di assunzione. È raccomandabile, a tal proposito, predisporre un foglio informativo specifico per ogni tipologia di preparazione congiuntamente al Consenso Informato.

Dal punto di vista farmaceutico è importante che il titolo del prodotto allestito corrisponda alla prescrizione medica, dato che il dosaggio controllato è fondamentale per ottenere un effetto terapeutico. Per garantire ciò è opportuno sottoporre il preparato ad analisi analitiche *ad hoc* [11].

Infine, affinché il problema di responsabilità giuridica dovuta al possesso del preparato e al suo trasporto non ricada in capo al

paziente, è opportuna l'elaborazione di un modulo di consegna che ne attesti la liceità del possesso [12].

Conclusioni

I dati sono ancora insufficienti: vi sono ancora incertezze riguardo alle indicazioni specifiche, alle dosi ideali e agli effetti avversi correlati a questa sostanza quando usata per scopi medici. Gli effetti avversi neurocognitivi come l'apprendimento, la memoria e i deficit psicomotori sono comuni anche con un uso a breve termine e a basso dosaggio di Cannabis a uso medico, ma sembrano ben tollerati. Le conseguenze a lungo termine della Cannabis stessa rimangono sconosciute [13]. Con un maggiore uso della Cannabis terapeutica come terapia farmacologica per il dolore, nasce la necessità di approfondite valutazioni rischi-benefici, che tengano conto dei possibili effetti collaterali significativi della Cannabis [14]. Pertanto, sono necessari ulteriori studi sull'uomo, ben progettati con una grande dimensione del campione e un periodo di *follow-up* più lungo per confermare il ruolo delle piante medicinali e dei loro metaboliti nella gestione della sclerosi multipla [15], oltre a studi pre-clinici avanzati, a *clinical case reports* e corsi di formazione specifici nel settore farmaco-tossicologico.

Ad integrazione dei risvolti clinici connessi all'uso medico della Cannabis, anche l'analisi bioetica sottolinea l'importanza di un'accurata valutazione dei rischi e la necessità di introdurre mezzi volti ad attenuare implicazioni medico-legali, a tutela del paziente e dei professionisti sanitari coinvolti.

Note

1. UNODC, *World Drug Report 2009* – Fonte: *Calcoli UNODC con dati Fao Ecocrop*.
2. Fonte: *Presidenza del Consiglio dei Ministri. Dipartimento delle politiche antidroga, 2016*.
3. Muro A, Cladellas R, Castellà J. *Cannabis and Its Different Strains. Exp Psychol.* 2021 Mar;68(2):57-66. doi: 10.1027/1618-3169/a000510. Epub 2021

Jun 22. PMID: 34155905.

4. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2015/11/30/15A08888/sg> (Ultimo accesso 18/03/2023).
5. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1998/05/08/098A3335/sg> (Ultimo accesso 18/03/2023).
6. *Management of Substance Abuse. World Health Organization; 2014. Available at: http://www.who.int/substance_abuse/facts/cannabis/en/* (Ultimo accesso: 18/03/2023).
Cannabis and Cannabinoids. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34850895/ (Ultimo accesso: 18/03/2023).
7. <https://antidroga.interno.gov.it/wp-content/uploads/2019/05/L.-14-dicembre-2000-n.-376-.pdf> (Ultimo accesso: 18/03/2023).
8. <https://www.aci.it/i-servizi/normative/codice-della-strada/titolo-v-norme-di-comportamento/art-187-guida-in-stato-di-alterazione-psico-fisica-per-uso-di-sostanze-stupefacenti.html#:~:text=187.-,%20Guida%20in%20stato%20di%20alterazione%20psico%2Dfisica%20per%20uso%20di,sei%20mesi%20ad%20un%20anno> (Ultimo accesso: 18/03/2023).
9. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2008/10/08/08A07139/sg> (Ultimo accesso: 18/03/2023).
10. <https://www.vigierbe.it/> (Ultimo accesso: 18/03/2023).
11. *Su tale aspetto, il Centro Regionale di Allestimento della Cannabis (CRAC) della Regione Marche presso l'UOC di Farmacia e Farmacologia Clinica dell'Ospedale Geriatrico "U. Sestilli" IRCCS-IRCA di Ancona, tenendo conto della variabilità delle preparazioni, ha standardizzato le preparazioni e ha effettuato, quando usate le infiorescenze per l'allestimento, analisi gascromatografica e spettrometria di massa. Con l'utilizzo dell'estratto oleoso di Cannabis al 15%, non essendo più necessaria l'analisi dell'oleolita, il CRAC ha provveduto a elaborare una procedura operativa ad hoc per controllo del dosaggio.*
12. *Per tale problematica, il CRAC ha elaborato, in accordo con le Autorità di Polizia e giudiziarie, un proprio modulo di consegna da rilasciare al paziente, bilingue (italiano/inglese), che gli consente di poter trasportare il preparato nel tragitto ospedale/casa o durante eventuali viaggi con i diversi mezzi di trasporto (auto, aerei, navi, treni).*
13. Deshpande A, Mailis-Gagnon A, Zoheiry N, Lakha SF. *Efficacy and adverse effects of medical marijuana for chronic noncancer pain: Systematic review of randomized controlled trials. Can Fam Physician.* 2015 Aug;61(8): e372-81. PMID: 26505059; PMCID: PMC4541447.
14. Hill KP, Palastro MD, Johnson B, Ditre JW. *Cannabis and Pain: A Clinical Review. Cannabis Cannabinoid Res.* 2017 May 1;2(1):96-104. doi: 10.1089/can.2017.0017. PMID: 28861509; PMCID: PMC5549367.
15. Farzaei MH, Shahpiri Z, Bahramsoltani R, Nia MM, Najafi F, Rahimi R. *Efficacy and Tolerability of Phytomedicines in Multiple Sclerosis Patients: A Review. CNS Drugs.* 2017 Oct;31(10):867-889. doi: 10.1007/s40263-017-0466-4. PMID: 28948486.

Un breve *excursus* tra le nanoparticelle: diversa natura, diverso utilizzo e diversi possibili approcci tossicologici

Valentina Galbiati, Martina Iulini

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

UN BREVE EXCURSUS TRA LE NANOPARTICELLE: NATURA, UTILIZZO E APPROCCI TOSSICOLOGICI

Grazie alle loro proprietà fisiche uniche, negli ultimi decenni le nanoparticelle (NP) sono state prodotte in misura crescente per molte applicazioni industriali e biomediche. Data la loro presenza ubiquitaria e la conseguente inevitabile esposizione ad esse, le nanoparticelle ricoprono sempre di più un ruolo di notevole interesse anche da un punto di vista tossicologico.

Nel minisimposio tenutosi durante il 27° Congresso Nazionale della SITOX è stato fatto un *excursus* delle diverse possibili applicazioni delle nanoparticelle, partendo da un approccio di pura ricerca scientifica basata sull'utilizzo di un modello sperimentale esposto a differenti nanoparticelle, passando successivamente ad una visione terapeutica/medica di utilizzo delle nanoparticelle proteiche e la loro valutazione tossicologica, e concludendo con l'importante valutazione dell'aspetto regolatorio dei *carbon nanotubes*, nanoparticelle estremamente diffuse e dalla conformazione pressochè unica.

Nel lavoro proposto da **Davide Asnicar** (*Huntsman Marine Science Centre* in New Brunswick, Canada) dal titolo "Approccio di valutazione dell'impatto di Nanoparticelle su organismi non target: la vongola filippina come caso di studio" è emerso come, attraverso i processi produttivi e il loro utilizzo quotidiano, le NP possono essere rilasciate nell'ambiente attraverso i deflussi industriali e urbani, raggiungendo l'ambiente marino costiero ed entrando nella rete trofica marina. In questo modo, le NP rappresentano fattori di stress emergenti per gli organismi marini. Nel lavoro proposto le vongole della specie *Ruditapes philippinarum* sono state esposte per 7 giorni a tre singole nanoparticelle (fullerene C60, ossido di zinco e biossido di titanio), a due concentrazioni rilevanti per l'ambiente (1 e 10 µg/L). Al termine dell'esposizione, è stato utilizzato un approccio multi-biomarker al fine di stimare il potenziale stato di squilibrio tra specie reattive dell'ossigeno e difese antiossidanti, nonché del danno ossidativo che potrebbe

derivare dall'esposizione ai contaminanti. L'attività di enzimi antiossidanti (SOD, CAT, GST) e la quantificazione del danno ossidativo (PCC, LPO) sono stati misurati sia nelle branchie che nella ghiandola digestiva delle vongole. Nel complesso, la modulazione dell'attività dei tre enzimi indagati evidenzia un aumento dello stress ossidativo nelle vongole esposte alle nanoparticelle. Il danno ossidativo si manifesta solo dopo esposizione a FC60 e nTiO₂, ma evidenziando una differenza nel "mode of action" delle due molecole, interessando nel primo caso le proteine delle branchie, nel secondo i lipidi della ghiandola digestiva. Danni limitati alle macromolecole suggeriscono una difesa antiossidante adeguata a proteggere le cellule alle concentrazioni di NP testate in questo lavoro.

Successivamente, **Leopoldo Sitia** (Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche, Università degli Studi di Milano) con un intervento dal titolo "*Nanoparticelle proteiche impiegate nell'imaging e nel trattamento di tumori solidi: il caso della ferritina nanocage*" ha mostrato come le NP siano ampiamente utilizzate anche dal punto di vista terapeutico e diagnostico. I primi esempi di successo clinico di questa strategia sono in ambito tumorale: un esempio è Abraxane®, NP di albumina caricate con paclitaxel per il trattamento del tumore del polmone non a piccole cellule e Myocet® e Doxil®/Caelyx®, liposomi caricati con doxorubicina utilizzati per il trattamento di diversi tumori solidi [Batist G, Barton J, Chaikin P, Swenson C, Welles L. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2002 Dec;3(12):1739-51. doi: 10.1517/14656566.3.12.1739. PMID: 12472371]. Come in tutti i campi, prima di arrivare alla clinica, un'enorme varietà di NP è stata proposta e studiata a livello pre-clinico. I ricercatori sono d'accordo che, a seconda dell'obiettivo desiderato, ad esempio diagnosi o terapia, tali parti-

celle debbano possedere caratteristiche diverse. In generale, per aumentarne le possibilità di successo, le NP devono possedere le seguenti caratteristiche: essere stabili in fluidi biologici, avere dimensioni tali da non essere sequestrate dal fegato o escrete dai reni, non essere tossiche e soprattutto avere un profilo farmacocinetico tale da raggiungere in maniera efficace il bersaglio [Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond).* 2016 Mar;11(6):673-92. doi: 10.2217/nnm.16.5. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27003448; PMCID: PMC5561790]. Una classe di NP molto promettente di cui si è discusso è formata dalle nanogabbie di ferritina. La ferritina è una proteina ubiquitaria, presente nell'organismo sia a livello plasmatico che intracellulare. La ferritina è formata da 24 subunità di due isoforme diverse, che si autoassemblano in una struttura a nanogabbia con il diametro del guscio esterno di 12 nm e una cavità interna di 8 nm. All'interno di tale cavità è possibile caricare diversi farmaci o agenti di contrasto rispettivamente per scopi terapeutici e diagnostici. Inoltre, è stato dimostrato che l'isoforma H ha una particolare affinità per il recettore di membrana per la Transferrina 1 (TfR1). Tale recettore è overespresso nella maggior parte delle cellule tumorali, per cui può essere utilizzato come target specifico dei tumori [Mainini, F.; Bonizzi, A.; Sevieri, M.; Sitia, L.; Truffi, M.; Corsi, F.; Mazzucchelli, S. Protein-Based Nanoparticles for the Imaging and Treatment of Solid Tumors: The Case of Ferritin Nanocages, a Narrative Review. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2000. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122000>]. Infine, essendo un materiale biocompatibile, la sua tossicità è minima. Per tutte queste ragioni, ed essendo possibile produrre grandi quantità di ferritina H (HF_n) in laboratorio per via ricombinante a basso costo, questo tipo di particelle è particolarmente interessante al fine di svi-

luppate nuovi agenti diagnostici e terapeutici in ambito oncologico. Nell'ambito del Congresso sono stati mostrati diversi esperimenti che dimostrano come l'HFn caricata con doxorubicina abbia dato risultati di efficacia paragonabili al già citato Doxil® in un modello di tumore al seno triplo negativo (TNBC). In parallelo, l'HFn caricata con verde di indocianina (ICG), un marcatore fluorescente già utilizzato in test clinici per chirurgia guidata da fluorescenza, ha permesso di migliorare la specificità di *targeting*, distinguendo con precisione i margini tumorali dal tessuto sano circostante in un modello preclinico di TNBC. Nonostante questi promettenti risultati preliminari, non è ancora ben chiaro come ottimizzare le caratteristiche delle NP post-sintesi al fine di garantire il successo di tali approcci per uno sviluppo clinico. Le interazioni con l'organismo, infatti, sono in grado di modificare in modo marcato le proprietà delle particelle, influenzandone la biodistribuzione, la stabilità e anche la tossicità.

Infine, anche l'aspetto regolatorio è stato affrontato grazie all'intervento di **Andrea Spinazzè** (Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia - DiSAT, Università degli Studi dell'Insubria) con una presentazione dal titolo *"Approccio probabilistico per la valutazione del rischio a nanomateriali: casi studio in scenari di esposizione occupazionale"*. Andrea Spinazzè ha mostrato un metodo in grado di applicare la procedura di *risk assessment* per lo studio di *nanoplatelets* di grafene (GNPs: *graphene nanoplatelets*) [Spinazzè, A., Cattaneo, A., Borghi, F., et al. (2019). Probabilistic approach for the risk assessment of nanomaterials: A case study for graphene nanoplatelets. *Int J Hyg Environ Health*, 222(1):76-83. doi: 10.1016/j.ijheh.2018.08.011] e nanotubi di carbonio (CNTs: *carbon nanotubes*) [Spinazzè A, Zellino C, Borghi F, et al. (2021). Carbon Nanotubes: Probabilistic Approach for Occupational Risk Assessment. *Nanomaterials*, 11(2):409. doi: 10.3390/nano11020409].

I NP sono stati scelti come casi studio a causa del loro largo utilizzo in numerose applicazioni tecnologiche e della contestuale mancanza di informazioni riguardo il potenziale impatto sulla salute derivante dall'esposizione a tali NP. La valutazione del rischio è stata effettuata applicando la procedura tipicamente suddivisa in quattro fasi propedeutiche: (I) identificazione del pericolo, (II) valutazione della relazione dose-risposta, (III) valutazione dell'esposizione e (IV) caratterizzazione del rischio [National Research Council. *Risk assessment in the federal government. Managing the process*; National Academy Press: Washington D.C., 1983]. Nel corso dell'intervento è emerso come è bene sottolineare che alcuni limiti possono influire nell'interpretazione dei risultati e i limiti principali dello studio riguardano: l'eterogeneità delle proprietà chimico-fisiche delle NP, che possono aver determinato un certo grado di incertezza nella fase di valutazione del pericolo, ma anche alcune assunzioni, necessarie nella definizione di distribuzioni parametriche, che inevitabilmente introducono incertezze nella struttura del modello usato per la valutazione del rischio ed, infine, la selezione delle fonti usate per la valutazione del pericolo le quali potrebbe avere introdotto un *bias* nella procedura di valutazione del rischio. Nonostante queste limitazioni, lo studio presenta alcuni punti di forza: questo approccio ha consentito di ottenere una stima di un valore raccomandato di esposizione per due NP (BMCh), e consente di tenere conto della variabilità derivante dall'incertezza dei dati usati come fonte di informazioni per le fasi di valutazione della relazione dose-risposta, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio, includendo quindi questa variabilità intrinseca nella procedura di valutazione del rischio. Dunque, l'approccio utilizzato consente di quantificare la probabilità associata all'accadimento di un rischio potenziale, includendo anche l'incertezza ad

essa associata e riportandone quantitativamente l'impatto sul risultato finale. Per concludere un approccio probabilistico è stato applicato in studi di valutazione del rischio per l'esposizione a NP in diversi scenari di esposizione occupazionali. Simulazioni stocastiche sono state utilizzate per le fasi di valutazione dose-risposta, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio, consentendo l'introduzione di fonti di incertezza, il cui impatto sulla procedura di *risk assessment* è stato successivamente quantificato mediante un'analisi di sensibilità. L'approccio probabilistico adottato ha permesso di definire quantitativamente la probabilità che si verifichi una condizione di rischio per ciascuno scenario investigato, consentendo la valutazione di specifiche misure di gestione del rischio.

Al termine degli interventi si è generata una discussione molto stimolante che ha portato alla luce alcuni problemi comuni a chi lavora con le NP. È emersa la necessità di standardizzare i metodi analitici utilizzati per la quantificazione delle NP, determinando linee guida che tutti gli esperimenti dovrebbero seguire affinché i risultati siano affidabili. Strumenti diversi danno risposte relative a caratteristiche diverse delle NP che meritano di essere prese in considerazione: forma, dimensioni, struttura, analisi della superficie, sostanze adsorbite, aggregati. È emerso come sia molto importante in questo tipo di studi analizzare le caratteristiche chimico-fisiche delle NP, il loro bioaccumulo a livello dei tessuti e i loro effetti come particelle separate o aggregate. È inoltre emerso che in ambito ecotossicologico/ambientale una delle sfide è introdurre il monitoraggio della presenza in acqua delle NP che rende difficile effettuare *risk assessment* per fornire dati a sostegno delle soglie normative e dello sviluppo di standard di qualità ambientale. Variazioni in parametri ambientali potrebbero alterare, infatti, la tossicità delle NP: in un contesto di cambiamento climatico nel quale stia-

mo vivendo, studi che valutino variazioni di effetto di un contaminante in base a temperatura, salinità, pH e ossigeno disciolto sono sicuramente necessari per predirne gli effetti.

Le nanoparticelle rappresentano un argomento di grandissima attualità e sicuramente riguarderanno il futuro prossimo di chi lavora nell'ambito della ricerca sperimentale e regolamentatoria. Un ambito sicuramente in continua evoluzione che lascia quindi aperte ancora moltissime possibilità di studio e approfondimento.

Immagine di copertina

Dea Igea, figlia di Asclepio e di Lampeggia, venerata come dea della salute. Veniva raffigurata ora sotto l'aspetto di una giovane donna prosperosa nell'atto di dissetare un serpente, ora seduta con la mano sinistra appoggiata a un'asta, mentre con l'altra mano porge una patera a un serpente che, lambendola, si innalza da un'ara posta davanti a lei.

Il culto era associato a quello del padre e di Panacea, sua sorellastra. Oltre che dea della salute (o del risanamento in generale), era la divinità di ogni cosa pulita. A differenza del padre, direttamente e unicamente associato alla cura delle malattie, Igea veniva invece associata alla prevenzione dalle malattie e al mantenimento dello stato di salute.

La presenza del serpente è dovuta al fatto che gli antichi attribuivano al rettile intelligenza e sentimenti particolari: suscitava grande impressione per la vita misteriosa e sotterranea, per la capacità di secernere veleni mortali, per la grande velocità, nonché per l'abilità nell'ipnotizzare le prede. Il serpente è comunque legato da sempre al mondo della farmacologia: il suo veleno, in minime dosi, rappresentava spesso l'unico rimedio contro moltissime malattie.

I frammenti in cui è scomposta l'immagine rappresentano uno specchio che riflette le diverse sfaccettature della nostra disciplina (ambientale, clinica, preclinica etc).



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.

Il Giornale Italiano di Tossicologia è scaricabile online.

Visita il nostro sito www.sitox.org