

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**XIV Congresso Nazionale
della Società Italiana di Tossicologia**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 6-9 febbraio 2006

RIASSUNTI

A cura di
Maria Francesca Cometa¹, Emma Di Consiglio²,
Simonetta Gemma², Laura Parisi¹, Maria Teresa Volpe¹

¹*Dipartimento del Farmaco*

²*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
06/C1

Istituto Superiore di Sanità

XIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 6-9 febbraio 2006. Riassunti.

A cura di Maria Francesca Cometa, Emma Di Consiglio, Simonetta Gemma, Laura Parisi, Maria Teresa Volpe

2006, xxiv, 293 p. ISTISAN Congressi 06/C1 (In Italiano e in Inglese)

La tossicologia rappresenta una disciplina che si occupa degli effetti dannosi esercitati da agenti biologici, chimici e fisici, su tutti gli esseri viventi. La ricerca e lo studio delle sostanze potenzialmente pericolose contribuisce alla risoluzione di problemi connessi alla sicurezza del loro uso per l'uomo e l'ambiente. Scopo del Congresso è di fornire informazioni sui più recenti orientamenti della ricerca ed aggiornamenti normativi sulla valutazione del rischio per l'uomo e l'ambiente derivato dall'impiego di prodotti chimici industriali, farmaci, additivi, inquinanti ambientali e pesticidi. Il programma scientifico includerà letture magistrali, sessioni plenarie e parallele, comunicazioni orali, poster e tavole rotonde. E' previsto inoltre un Corso di aggiornamento su cocaina, ecstasy e amfetamine 2006: "La presa in carico del paziente intossicato" (Corso ECM n. 4114 - 224299).

Parole chiave: Tossicologia, Ambiente, Sviluppo di nuove molecole, Linee Guida

Istituto Superiore di Sanità

XIV National Meeting of the Italian Society of Toxicology. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 6-9 February 2006. Abstract book.

Edited by Maria Francesca Cometa, Emma Di Consiglio, Simonetta Gemma, Laura Parisi, Maria Teresa Volpe

2006, xxiv, 293 p. ISTISAN Congressi 06/C1 (In Italian and English)

Toxicology studies the damaging effects exercised by biological, chemical and physical agents, on all the living beings. The search and the study of potentially dangerous substances contribute to the solution of problems connected to the safety of their use for the man and the environment. Purpose of the Meeting is to give information about the most recent trends of the research and normative updatings on the risk assessment for the man and the environment due to industrial chemical products, drugs, additives, polluting and pesticides. The scientific program includes magistral readings, plenary and parallel sessions, oral communications, poster and round tables. Besides a course is foreseen on cocaine, ecstasy and amfetamine 2006: "The taking in load of the poisoned patient" (Corso ECM no. 4114 -- 224299).

Key words: Toxicology, Environment, New molecules development, Guidelines

Per informazioni su questo documento scrivere a: cometa@iss.it

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2005 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

Il Congresso è stato organizzato da:

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità (ISS)
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità (ISS)
Società Italiana di Tossicologia (SITOX)

Presidenti

Annarita Meneguz
Emanuela Testai

Comitato Scientifico

Giorgio Cantelli Forti	Enzo Chiesara
Orazio Cantoni	Lucio Guido Costa
Amelia Filippelli	Maria Enrica Fracasso
Corrado L. Galli	Erminio Giavini
Luciana Gramiccioni	Patrizia Hrelia
Carlo Locatelli	Marina Marinovich
Paolo Preziosi	Sergio Raimondo
Patrizia Restani	Stefano Vella

Segreteria Scientifica

M.F. Cometa	Dipartimento del Farmaco, ISS (cometa@iss.it)
E. Di Consiglio	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, ISS (emmadc@iss.it)
S. Gemma	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, ISS (sgemma@iss.it)

Segreteria Tecnica

F. Magnani	Dipartimento del Farmaco, ISS
S. Fortuna	Dipartimento del Farmaco, ISS
P. Lorenzini	Dipartimento del Farmaco, ISS
M.T. Volpe	Dipartimento del Farmaco, ISS
P. Campagna	Dipartimento del Farmaco, ISS (campagna@iss.it)

Segreteria Organizzativa Iscrizioni al Congresso

SITOX
Viale Abruzzi 32
20131 Milano
Tel 02 29520311
Fax 02 29520179/700590939
E-mail: sitox@sagr.it

INDICE

Note per la consultazione	v
Programma schematico	vi
Programma	ix
Lettura Magistrale	
Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes: implications for drug response and xenobiotic toxicity	1
Sessione Plenaria	
La Sicurezza chimica: innovazioni e nuove sfide	3
Portale Tox	
The world library of toxicology; il portale mondiale di tossicologia	10
Prima Sessione	
Tossicità d'organo (Aula Pocchiari).....	11
Xenobiotici e rischio cancerogeno (Aula Bovet)	19
Effetti di lungo termine di danno ontogenetico su indici neurocomportamentali: modelli animali (Aula Marotta).....	27
Seconda Sessione	
Valutazione del rischio nell'esposizione professionale e ambientale a benzene: studio dei meccanismi di attivazione e tossicità e degli indicatori di esposizione, effetto e suscettibilità (Aula Pocchiari)	35
Nuove acquisizioni sui meccanismi neurobiologici e neurotossicologici delle sostanze d'abuso (Aula Bovet)	49
Xenobiotici nella catena alimentare (Aula Marotta).....	57

Terza Sessione

Neurotossicità (Aula Pocchiari)	67
Tossicologia <i>in vitro</i> (Aula Bovet).....	75
Qualità dell'ambiente e protezione salute (Aula Marotta)	83

Sessione Plenaria

La sicurezza dei prodotti farmaceutici: innovazioni e nuove sfide (Aula Pocchiari)	91
---	----

Quarta Sessione

Pesticidi: dalla ricerca al controllo (Aula Pocchiari).....	99
Stress ossidativo (Aula Marotta)	109
Stili di vita: fumo, alcool e droghe d'abuso (Aula Dipartimento di Ambiente)	117

Quinta Sessione

Nuove prospettive nell'utilizzo di composti di origine naturale per la prevenzione di eventi tossici (Aula Pocchiari).....	125
Nuovi modelli sperimentali per lo studio della tossicità della riproduzionee dello sviluppo (Aula Dipartimento di Ambiente)	133
Meccanismi molecolari di morte cellulare (Aula Marotta).....	141

Sessione Plenaria dedicata a Marvin S. Legator (Aula Pocchiari).....	151
---	-----

Sesta Sessione

Aspetti regolatori nello sviluppo di nuove molecole (Aula Pocchiari).....	157
Tossicologia clinica: intossicazioni acute e centri antiveneni (Aula Bovet) ..	165

Poster (Aula Pocchiari)	177
--------------------------------------	-----

7 febbraio 2006 (1 - 34)	179
--------------------------------	-----

8 febbraio 2006 (35 - 70)	217
---------------------------------	-----

9 febbraio 2006 (71 - 101)	254
----------------------------------	-----

Indice degli autori	293
----------------------------------	-----

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente lavoro raccoglie le Presentazioni orali e i Poster dei contributi scientifici presentati al Congresso.

Le Presentazioni orali sono divise per ogni singola giornata in:

- Lettura Magistrale (Aula Pocchiari)
- Sessioni Plenarie (Aula Pocchiari)
- Sessioni parallele, numerate da I a VI (Aula Pocchiari, Aula Bovet, Aula Marotta, Aula Dipartimento di Ambiente).

I Poster sono numerati in ordine crescente e consecutivo nelle giornate del Congresso.

Viene di seguito riportato un Programma schematico al fine di facilitare la comprensione dell'organizzazione di tutti i momenti scientifici del Congresso.

Alla fine del volume è presente un indice degli autori di ogni singolo contributo.

PROGRAMMA SCHEMATICO

Lunedì 6 febbraio		
AULA BOVET	AULA POCCHIARI	AULA MAROTTA
	<p>Lettura Magistrale 17.00 Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes: implications for drug response and xenobiotic toxicity</p>	
Martedì 7 febbraio		
	<p>Sessione Plenaria 08.30 La sicurezza chimica: innovazioni e nuove sfide</p>	
	<p>11.30 The world library of toxicology, il portale mondiale di tossicologia</p>	
<p>Prima sessione 12.00 Xenobiotici e rischio cancerogeno</p>	<p>Prima sessione 12.00 Tossicità d'organo</p>	<p>Prima sessione 12.00 Effetti di lungo termine di danno ontogenetico su indici neurocomportamentali: modelli animali</p>
	<p>13.30 <i>Presentazione Poster</i></p>	
<p>Seconda sessione 15.00 Nuove acquisizioni sui meccanismi neurobiologici e neurotossicologici delle sostanze d'abuso</p>	<p>Seconda sessione 15.00 Valutazione del rischio nell'esposizione professionale e ambientale a benzene: studio dei meccanismi di attivazione e tossicità e degli indicatori di esposizione, effetto e suscettibilità</p>	<p>Seconda sessione 15.00 Xenobiotici nella catena alimentare</p>
<p>Terza sessione 17.30 Tossicologia <i>in vitro</i></p>	<p>Terza sessione 17.30 Neurotossicità</p>	<p>Terza sessione 17.30 Qualità dell'ambiente e protezione salute</p>
<p>In contemporanea per tutto il corso della giornata presso il Dipartimento di Farmacologia dell'Università La Sapienza di Roma si terrà il Simposio Satellite di Tossicologia Clinica-Corso ECM "Cocaina, ecstasy e amfetamine 2006: la presa in carico del paziente intossicato"</p>		

Mercoledì 8 febbraio		
AULA DIPARTIMENTO DI AMBIENTE	AULA POCCHIARI	AULA MAROTTA
	<p align="center">Sessione Plenaria</p> <p align="center">08.30 La Sicurezza dei prodotti farmaceutici: innovazioni e nuove sfide</p>	
<p align="center">Quarta sessione</p> <p align="center">11.30 Stili di vita: fumo, alcool e droghe d'abuso</p>	<p align="center">Quarta sessione</p> <p align="center">11.30 Pesticidi: dalla ricerca al controllo</p>	<p align="center">Quarta sessione</p> <p align="center">11.30 Stress ossidativo</p>
	<p align="center">13.00 <i>Presentazione Poster</i></p>	
<p align="center">Quinta sessione</p> <p align="center">14.30 Nuovi modelli sperimentali per lo studio della tossicità della riproduzione e dello sviluppo</p>	<p align="center">Quinta sessione</p> <p align="center">14.30 Nuove prospettive nell'utilizzo di composti di origine naturale per la prevenzione di eventi tossici</p>	<p align="center">Quinta sessione</p> <p align="center">14.30 Meccanismi molecolari di morte cellulare</p>
	<p align="center">17.15 Assemblea SITOX</p>	
<p>Aula Bovet. In contemporanea dalle 8.45 alle 17.30 si svolgerà una giornata dal titolo: "La tossicologia clinica nel panorama sanitario italiano ed europeo" (Referente Scientifico: C. Locatelli)</p>		

Giovedì 9 febbraio		
AULA BOVET	AULA POCCHIARI	AULA MAROTTA
	Sessione Plenaria 09.30 dedicata a Marvin S. Legator	
Sesta sessione 11.30 Tossicologia clinica: intossicazioni acute e centri antiveleni	Sesta sessione 11.30 Aspetti regolatori nello sviluppo di nuove molecole	
	13.15 <i>Presentazione Poster</i>	
	14.15 Discussione Poster e Premio Bronzetti	
	15.15 <i>Tavola Rotonda: L'adeguatezza degli attuali protocolli di valutazione per la sicurezza di sostanze chimiche e farmaci</i>	
	16.45 <i>Conclusioni e chiusura del Congresso</i>	

PROGRAMMA

Lunedì, 6 febbraio 2006

- 14.00 Registrazione dei partecipanti
- 16.00 Cerimonia di Apertura
- 17.00 **Lettura Magistrale.** *Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes: implications for drug response and xenobiotic toxicity*
M. Ingelman-Sundberg
- 18.30 Cocktail di benvenuto

Martedì, 7 febbraio 2006

Sessione Plenaria Aula Pocchiari

LA SICUREZZA CHIMICA: INNOVAZIONI E NUOVE SFIDE

Moderatori: **G. Cantelli Forti, L. Gramiccioni**

- 08.30 *La politica delle sostanze chimiche: passato, presente e futuro*
P. Di Prospero
- 09.00 *L'approccio dell'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) per la valutazione dei cancerogeni genotossici*
R. Crebelli
- 09.30 *Contaminanti organici persistenti e salute umana: problematiche emergenti*
E. De Felip
- 10.00 *Interazioni tra xenobiotici e valutazione del rischio di esposizioni combinate: una sfida per il futuro*
E. Testai
- 10.30 *Sostanze cancerogene e Threshold of Toxicological Concern (TTC)*
C.L. Galli
- 11.00 Intervallo
- 11.30 **Portale Tox.** *The world library of toxicology - il portale mondiale di tossicologia*
M. Marinovich, M. Della Seta, C. Calicchia

Prima Sessione Aula Pocchiari

TOSSICITÀ D'ORGANO

Moderatori: **E. Chiesara, P. Preziosi**

- 12.00 *Sviluppo e validazione di un nuovo modello sperimentale di aritmia indotta da ouabaina nel ratto anestetizzato*
M.F. Cometa, P. Campolongo, V. Trezza, M. Palmery
- 12.15 *L'attività della PARG media il danno intestinale indotto da occlusione e ri-perfusione dell'arteria splancnica*
S. Cuzzocrea, R. Di Paola, E. Mazzon, U. Cortes, T. Genovese, C. Muià, W. Li, W. Xu, J.H. Li, J. Zhang, Z.Q. Wang
- 12.30 *Ruolo dei ligandi endogeni ed esogeni per PPAR- α (Peroxisome Proliferators Activated Receptors alpha) nello sviluppo del danno polmonare indotto da bleomicina*
T. Genovese, E. Mazzon, R. Di Paola, C. Muià, C. Crisafulli, A.P. Caputi, S. Cuzzocrea
- 12.45 *Cardiovascular Safety Pharmacology: un approccio integrato*
A. Morisetti, S. Bussi
- 13.00 *Il prolungamento dell'intervallo QT: azioni e reazioni*
R. Bertini Malgarini, A. Meneguz, P. Tucci, G. Pimpinella
- 13.15 *Effetti dell'ossigenoterapia iperbarica sulla cascata coagulativa in un modello sperimentale di sindrome da insufficienza multiorgano*
F. Imperatore, W. Filippelli, D. De Lucia, G. Liguori, M. Sessa, C. Luongo, L. Lambiase, M. Capuano, B. Rinaldi, A. Filippelli, F. Rossi

Prima Sessione Aula Bovet

XENOBIOTICI E RISCHIO CANCEROGENO

Moderatori: **A. Carere, M. E. Fracasso**

- 12.00 *Cancerogenesi e genotossicità del furano*
A. Carere
- 12.15 *Frammentazione del DNA indotta in cellule di polmone di ratto e umane da cinque composti chimici cancerogeni per il polmone di ratto*
D. Baroni, L. Robbiano
- 12.30 *Considerazioni sull'incapacità della batteria standard dei test di genotossicità di identificare alcuni cancerogeni genotossici*
A. Martelli, G. Brambilla

- 12.45 *Effetto genotossico di alcuni calcio antagonisti e dei loro nitrosoderivati*
M. Gosmar, V. Manfredi, C. Garbero, N. Trucco, A. Martelli
- 13.00 *Foci privi di mucine (MDF) come biomarcatori della cancerogenesi colica in ratti indotti col cancerogeno colon specifico 1,2 dimetilidrazina*
A. P. Femia, M. Salvadori, P. Dolara, C. Bottini, L. Tessitore, G. Caderni
- 13.15 *Caratterizzazione delle varianti di splicing della DNA polimerasi beta nel cancro gastrico*
V. Simonelli, M. D'Errico, P. Fortini, C. Sapeva, D. Palli, E. Dogliotti

Prima Sessione Aula Marotta

EFFETTI DI LUNGO TERMINE DI DANNO ONTOGENETICO SU INDICI NEUROCOMPORAMENTALI: MODELLI ANIMALI

Moderatori: E. Alleva, L.G. Costa

- 12.00 *Introduzione*
Modelli sperimentali predittivi di vulnerabilità nell'uomo: criticità per il Terzo Millennio
E. Alleva, I. Branchi
- 12.15 *Neurodegenerazione dopo ipossia-ischemia durante lo sviluppo cerebrale: decorso temporale e opportunità terapeutiche*
W. Balduini
- 12.30 *Rischio multifattoriale di disordini neurocomportamentali in età evolutiva*
G. Calamandrei
- 12.45 *Xenoestrogeni: effetti neurocomportamentali a lungo termine nel ratto*
F. Dessì-Fulgheri, D. Della Seta, V. Belloni, F. Farabollini
- 13.00 *Glucocorticoidi perinatali e "programmazione" a lungo termine*
A. Catalani, P. Casolini, S. Maccari
- 13.30 *Presentazione Poster e Pranzo*

Seconda Sessione Aula Pocchiari

VALUTAZIONE DEL RISCHIO NELL'ESPOSIZIONE PROFESSIONALE E AMBIENTALE A BENZENE: STUDIO DEI MECCANISMI DI ATTIVAZIONE E TOSSICITÀ E DEGLI INDICATORI DI ESPOSIZIONE, EFFETTO E SUSCETTIBILITÀ

Moderatori: V. Foà, P. Hrelia, M. Manno (coordinatore)

Rapporteur: L. Manzo

- 15.00 *Presentazione del progetto e introduzione*
M. Manno
- 15.05 *Effetto del trattamento subcronico con benzene in topi C57BL*
S. Dragoni, G. Materozzi, G. Curci, P. Franceschetti, D. Doria, M.E. Fracasso, M. Valoti
- 15.20 *Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione a benzene*
G.B. Bartolucci, M. Carrieri, P. Piccoli, P. Gori, I. Maccà, M.L. Scapellato, P. Franceschetti, M.E. Fracasso, L. Soleo, M. Manno
- 15.35 *Esposizione a basse dosi di benzene: correlazioni fra marker d'esposizione e marker d'effetto*
M.E. Fracasso, P. Franceschetti, D. Doria, G.B. Bartolucci, M. Carrieri, P. Lovreglio, A. Ballini, M. Manno, L. Soleo
- 15.50 *Aberrazioni cromosomiche (CA) e indice proliferativi (PI) in un gruppo di addetti al rifornimento di carburante esposti a basse dosi di benzene*
L. Soleo, P. Lovreglio, A. Ballini, G.B. Bartolucci, M. Carrieri, P. Franceschetti, D. Doria, M. Manno, M.E. Fracasso
- 16.05 *Biomarcatori genetici e di suscettibilità per la valutazione del rischio da benzene ambientale in agenti di polizia*
F. Maffei, S. Angelini, F. Carbone, G. Cantelli Forti, R. Kumar, K. Hemminki, F.S. Violante, P. Hrelia
- 16.20 *Metodi analitici per la determinazione di benzene urinario, acido fenilmercapturico e addotti emoglobinici quali biomarcatori dell'esposizione a benzene: ottimizzazione, confronto e applicazioni*
P. Basilicata, N. Miraglia, G. Genovese, R. Guadagni, A. Simonelli, M. Pieri, L. Castiglia, A. Acampora, N. Sannolo
- 16.35 *Fenotipizzazione in vivo del CYP 2E1: una nuova metodica per il monitoraggio biologico nell'esposizione occupazionale e sperimentale a benzene*
P. Piccoli, M. Carrieri, F. Salamon, G.B. Bartolucci, M. Manno
- 16.50 Conclusioni del Rapporteur

Seconda Sessione Aula Bovet

NUOVE ACQUISIZIONI SUI MECCANISMI NEUROBIOLOGICI E NEUROTOSSICOLOGICI DELLE SOSTANZE D'ABUSO

Moderatori: V. Cuomo, P. Nencini

- 15.00 *Meccanismi neurobiologici della dipendenza da nicotina*
W. Fratta

- 15.25 *Ruolo dei metaboliti nella dipendenza da eroina*
L. Antonilli, A. Badiani, P. Nencini
- 15.50 *Recidiva nell'abuso di alcol dopo estinzione: modelli sperimentali e meccanismi neurochimici*
M. Massi, D. Economidou, A. Cippitelli, C. Cifani, R. Ciccocioppo
- 16.15 *La somministrazione di metilfenidato in ratti adolescenti determina modifiche a breve e a lungo termine sui processi cerebrali del rinforzo e l'espressione genica nella regione dello striato*
G. Laviola, W. Adriani, D. Leo, D. Greco, U. di Porzio, C. Perrone-Capano
- 16.40 *Esposizione a cannabinoidi in fasi ontogenetiche precoci*
S. Gaetani, V. Cuomo

Seconda Sessione Aula Marotta

XENOBIOTICI NELLA CATENA ALIMENTARE

Moderatori: **M. Miraglia, P. Restani**

- 15.00 *Problemi di controllo qualità e sicurezza di integratori alimentari e preparazioni magistrali contenenti estratti di *Coleus forskholii**
P. Restani, K. Marangon, M.L. Colombo
- 15.15 *Esposizione alimentare a policlorodibenzo-p-diossine, policlorodibenzofurani, e policlorobi-fenili in Italia*
E. Fattore, R. Fanelli, A. Turrini, A. di Domenico
- 15.30 *Residui di eritromicina nella trota iridea d'acquacoltura*
A. Esposito, L. Fabrizi, D. Lucchetti, E. Guandalini, L. Marvasi, E. Coni
- 15.45 *L'effetto dell'Aflatossina B1 (AFB1) sull'attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE) rappresenta un nuovo approccio allo studio delle aflatossicosi in vitro e in vivo nel topo*
M.F. Cometa, P. Lorenzini, M.T. Volpe, S. Fortuna, L. Parisi, M. Palmery, A. Meneguz
- 16.00 *Acrilammide assunta attraverso la dieta o l'acqua da bere: biodisponibilità relativa nel suino*
F. Aureli, D. Lucchetti, M. Di Pasquale, L. Fabrizi, P. Aureli, E. Coni
- 16.15 *Effetto dell'etanolo presente nel vino rosso nell'assorbimento della quercetina in intestino isolato di ratto*
S. Dragoni, J. Gee, R. Bennett, M. Valoti, G. Sgaragli

16.30 *Octilfenolo e nonilfenolo in prodotti ittici del Mar Tirreno: valutazione dell'esposizione e del rischio per la popolazione Italiana*
F. Ferrara, N. Ademollo, M. Delise, F. Fabietti, E. Funari

16.45 *Effetti di due fusariotossine su cellule Jurkat: studio in vitro*
D. Luongo, L. Severino, P. Bergamo, R. De Luna, A. Lucisano, M. Rossi

17.00 Intervallo

Terza Sessione Aula Pocchiari

NEUROTOSSICITÀ

Moderatori: G. Calamandrei, E. Corsini

17.30 *BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) come esecutore dell'effetto neuroprotettivo di eritropoietina*
S. Bartesaghi, B. Viviani, E. Corsini, P. Villa, P. Ghezzi, A. Garau, C.L. Galli, M. Marinovich

17.45 *Esposizione perinatale a Delta-9-tetraidrocannabinolo nel ratto: effetti comportamentali e neurochimici*
P. Campolongo, T. Cassano, V. Trezza, M.G. Morgese, L. Ferraro, S. Tanganelli, V. Cuomo

18.00 *Ruolo dello scambiatore Na^+-Ca^{2+} nell'incremento di calcio intracellulare e nel danno neuronale indotti dai policlorurati bifenili in cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y*
S. Magi, P. Castaldo, G. Carrieri, G. Di Renzo, S. Amoroso

18.15 *IL-beta e recettore NMDA concorrono nella neurotossicità indotta dalla glicoproteina del virus HIV, GP120*
B. Viviani, F. Gardoni, S. Bartesaghi, E. Corsini, C.L. Galli, M. Di Luca, M. Marinovich

18.30 *Il farmaco antitumorale idrossiurea induce l'espressione genica di citochine pro-infiammatorie in espianti ipotalamici e in colture primarie di astrociti e microglia di ratto*
P. Navarra, G. Tringali, A.S.C. Fabricio, M.L. De Simone, M. Vairano, G. Pozzoli, P. Preziosi

18.45 *Riduzione, nel ratto, delle concentrazioni di BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) indotta da steroidi anabolizzanti*
S. Scaccianoce, S. Pace, G.I. Togna

Terza Sessione Aula Bovet

TOSSICOLOGIA IN VITRO

Moderatori: P. Prieto, A. Stammati

- 17.30 *Nuovi strumenti per studi di relazioni struttura-attività*
R. Benigni, C. Bossa
- 17.45 *Il COMET test quale mezzo di evidenza del danno apoptotico*
L. Marabini, S. Frigerio, E. Chiesara, S. Radice
- 18.00 *Studi in vitro sulle interazioni fra fluorochinoloni e enzimi farmaco-metabolizzanti epatici nel coniglio e nel ratto*
M. Cantiello, M. Dacasto, M. Carletti, P. Cagnardi, S. Carli, C. Nebbia
- 18.15 *Confronto tra due test in vitro per la valutazione del potenziale emolitico: approccio statico e dinamico*
A. Casartelli, M. Bonato, I. Masotto, L. Vandin
- 18.30 *Monografia OCSE No14: aspetti critici, punti di discussione e future prospettive*
S. Cinelli, M.M. Brunetti, A. Mosiello

Terza Sessione Aula Marotta

QUALITÀ DELL'AMBIENTE E PROTEZIONE SALUTE

Moderatori: S. Marchini, C. Zaghi

- 17.30 *Valori di riferimento per gli elementi in traccia in una popolazione urbana*
B. Bocca, G. Forte, A. Pino, C. D'Ippolito, A. Alimonti
- 17.45 *Mediatori dell'infiammazione in cellule RAW 264.7 indotti dal trattamento con particolato atmosferico (PM)*
R. Pozzi, F.R. Cassee, B. Brunekreef, T. Sandstrom, C. Guastadisegni
- 18.00 *COLUMBA LIVIA come specie sentinella di effetti tossici da inquinamento atmosferico urbano*
N. Prato, F. Orsi, M. Tringalli, A. Santagostino
- 18.15 *Monitoraggio numerico del materiale particolato nell'aria della città di Torino in presenza/assenza di limitazioni al traffico veicolare*
F. Casale, G. Nieddu, E. Burdino, G. Ugazio
- 18.30 *Progetto database ecotossicologico nazionale: prime elaborazioni*
N. Cerioli, D. Vagaggini, E. Cherubini

Mercoledì, 8 febbraio 2006

Sessione Plenaria Aula Pocchiarì

**LA SICUREZZA DEI PRODOTTI FARMACEUTICI: INNOVAZIONI
E NUOVE SFIDE**

Moderatori: **M. Massotti, S. Raimondo**

- 08.30 *Terapie innovative: esistono nuovi modelli sperimentali adeguati?*
S. Fais
- 09.00 *Epatotossicità: nuovi approcci per una valutazione precoce del danno*
A. Meneguz
- 09.30 *Medicinali per uso pediatrico: rilevanza dell'impiego di animali giovani negli studi non clinici*
L. Braghiroli, M.G. Leone, A. Meneguz
- 10.00 *Biotecnologie immunologiche e loro applicazioni*
M. Cianfriglia, M. Flego, A. Ascione
- 10.30 *Attività investigative a supporto degli studi regolatori nello sviluppo tossicologico del farmaco*
G. Dal Negro
- 11.00 Intervallo

Quarta Sessione Aula Pocchiarì

PESTICIDI: DALLA RICERCA AL CONTROLLO

Moderatori: **P. Cavallaro, E. Testai**

- 11.30 *Effetti immunomodulatori dell'erbicida propanil sul rilascio di citochine: studi in vivo e in vitro*
E. Corsini, S. Birindelli, M. Marinovich, C.L. Galli, C. Minoia, C. Colosio
- 11.45 *L'esposizione pre- e post-natale al clorpirifos induce alterazioni a lungo termine nella reattività locomotoria e nelle risposte a stimoli sociali in topi CDI*
L. Ricceri, A. Venerosi, F. Capone, E. Alleva, G. Calamandrei
- 12.00 *La bioattivazione del fenthion catalizzata da CYP e FMO umani ricombinanti*
C. Leoni, F.M. Buratti, E. Testai

- 12.15 *Valutazione dell'esposizione della popolazione italiana ai fitofarmaci attraverso il consumo di acqua destinata al consumo umano*
L. Fava, E. Alonzo, S. Finocchiaro, C. Strumia, V. Rossino, A. Martinelli, D. Bartoli, A. Ferronato, G. Sartori, L. Broglia, P.G. Calà, A. Franchi, M. Fardella, S. Scardala, M.A. Orrù, E. Funari
- 12.30 *Aspetti applicativi della Direttiva Preparati Pericolosi: le ricadute sui preparati fitosanitari seguito del processo di riclassificazione*
M. Rubbiani, L. Fornarelli, S. Bascherini, R. Binetti
- 12.45 *Sorveglianza delle intossicazioni acute da antiparassitari: osservazioni effettuate nel 2004*
L. Settimi, F. Davanzo, I. Marcello, A. Russo, C. Locatelli, I. Cilento, M.L. Farina, L. Faraoni, P. Maiozzi, A. Crobe, P. Carbone

Quarta Sessione Aula Marotta

STRESS OSSIDATIVO

Moderatori: W. Malorni, F. Rossi

- 11.30 *Ruolo delle ERK1/2 nel meccanismo di sopravvivenza mediato dall'acido arachidonico in cellule U937 esposte al perossinitrito*
L. Cerioni, O. Cantoni
- 11.45 *Le catechine, scavenger naturali di radicali liberi, come prevenzione dei danni indotti dall'ocratossina A, su una linea cellulare di rene di maiale*
S. Costa, R. Cervellati, E. Speroni, A. Utan, M.C. Guerra
- 12.00 *Il consumo giornaliero di olio di oliva ad alto contenuto di fenoli antiossidanti riduce il danno ossidativo al DNA in linfociti umani*
L. Giovannelli, V. Pitozzi, S. Salvini, D. Palli, D. Caruso, F. Visioli, N. Mulinacci, P. Dolara
- 12.15 *Effetto antiossidante della creatina in cellule di mammifero in coltura*
P. Sestili, C. Martinelli, G. Piccoli, D. Agostini, G. Bravi, A.M. Gioacchini, E. Falcieri, R. Curci, M. Battistelli, V. Stocchi
- 12.30 *Effetti dell'esercizio fisico prolungato sull'espressione di superossido dismutasi e heat shock protein in cuori di ratti anziani*
S. Boccuti, G. Corbi, N. Ferrara, B. Rinaldi, D. Cappetta, M. Capuano, F. Rossi, A. Filippelli
- 12.45 *Il blocco dei recettori mGlu1 del glutammato previene l'azione pro-apoptica e iperalgesica dei ROS in un modello murino di dolore neuropatico*
C. Fuccio, D. Siniscalco, L. Luongo, V. de Novellis, F. Rossi, S. Maione

Quarta Sessione Aula Dipartimento di Ambiente
STILI DI VITA: FUMO, ALCOOL E DROGHE D'ABUSO

Moderatori: P.F. Mannaioni, A. Nunziata

- 11.30 *Bias nei questionari di rilevazione di esposizione al fumo: una revisione della letteratura*
S. Morandi, C. Andreoli, A. Bassi, A. Nunziata
- 11.45 *Fattori nutrizionali, abuso alcolico e differenze di genere: la vitamina B1 e suoi esteri*
R. Mancinelli, R. Binetti, M.L. Attilia, P.A. Spagnolo, M. Romeo, C. Rotondo, M. Ceccanti
- 12.00 *Abuso alcolico e sistema immunitario*
R. Mancinelli, R. Riganò, B. Buttari, P. Margutti, E. Ortona, E. Profumo, T. Colasanti, F. Delunardo, C. Mazzoli, M. Ceccanti
- 12.15 *Dosaggio di ecstasy, amfetamine e cannabinoidi in fluidi biologici*
R. Mandrioli, F. Bugamelli, C. Baccini, M. Conti, G. Cantelli Forti, M.A. Raggi
- 12.30 *Studio sull'induzione di danno al DNA, micronuclei e alterazioni del ciclo cellulare prodotti da condensato di sigaretta*
C. Andreoli, F. Mercati, V. Marguglio, F. Flamma, A. Martino, A. Bassi, F. Caradonna, G. Sciandrello
- 12.45 *Effetti di un agonista dei recettori per i cannabinoidi in un modello di asma allergico nella cavia*
L. Giannini, D. Bani, F. Fabrizi, C. Uliva, P.F. Mannaioni, E. Masini
- 13.00 Presentazione Poster e Pranzo

Quinta Sessione Aula Pocchiari

NUOVE PROSPETTIVE NELL'UTILIZZO DI COMPOSTI DI ORIGINE NATURALE PER LA PREVENZIONE DI EVENTI TOSSICI

Moderatori: C.L. Galli, P. Hrelia

- 14.30 *Introduzione alla sessione*
P. Hrelia
- 14.40 *Isotiocianati e chemioprevenzione del cancro*
C. Fimognari
- 15.10 *Isotiocianati e neuroprotezione*
A. Tarozzi

- 15.30 *Antocianine, the verde ed estratto di iperico e infiammazione acuta e cronica*
S. Cuzzocrea
- 15.50 *Proteine della soja e aterosclerosi*
M.R. Lovati
- 16.10 *Piante alimentari e ottimizzazione per nuove prospettive*
P. Morazzoni
- 16.30 Presentazione orale selezionata
Reazioni avverse alle piante medicinali
G. Calapai, A. Pieratti, C. Mannucci, M. Tedesco, A.P. Caputi

Quinta Sessione Aula Dipartimento di Ambiente

NUOVI MODELLI SPERIMENTALI PER LO STUDIO DELLA TOSSICITÀ DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO

Moderatori: E. Giavini, A Mantovani

- 14.30 *Utilizzo di tecniche biomolecolari nello studio dei meccanismi d'azione di agenti teratogeni: il modello Acido Valproico*
V. Massa, F. Di Renzo
- 14.50 *Approcci integrati in vitro/in vivo per lo studio dei meccanismi d'azione di interferenti endocrini*
A. Mantovani, F. Maranghi, S. Lorenzetti, M.G. Evandri, P. Bolle
- 15.10 *Valutazione dell'embriotossicità in vitro mediante l'utilizzo di modelli complementari*
S. Zanoncelli, M. Longo, P. Colombo, M. Brughera
- 15.30 *Effetti cellulari e molecolari dei perturbatori endocrini sulla capacità di sviluppo degli ovociti*
T.A.L. Brevini, F. Gandolfi
- 15.50 *Sviluppo di un test tossicologico in vitro basato su gameti ed embrioni bovini*
G. Lazzari
- 16.10 Presentazione orale selezionata
Espressione di meccanismi di difesa in ratti esposti a PCB durante la gestazione e la lattazione
P. Bonfanti, A. Colombo, B. Costa, F. Orsi, F. Comelli, A. Santagostino

Quinta Sessione Aula Marotta

MECCANISMI MOLECOLARI DI MORTE CELLULARE

Moderatori: O. Cantoni, L.G. Costa

- 14.30 *Acido domoico: meccanismi molecolari di neurotossicità*
G. Giordano, T.J. Kavanagh, L.G. Costa
- 14.50 *La morte cellulare conseguente a stress del reticolo endoplasmatico: un modo nuovo per sconfiggere le cellule tumorali*
M. Piacentini
- 15.10 *Modificazioni mitocondriali precoci nell'apoptosi di linfociti T*
W. Malorni
- 15.30 *Sfingomielinasi e morte cellulare*
E. Clementi, C. Perrotta, C. De Palma, S. Falcone, C. Sciorati
- 15.50 *Meccanismi di sopravvivenza al perossinitrito in cellule del lineaggio monocitico/macrofagico*
O. Cantoni, I. Tommasini, L. Cerioni, A. Guidarelli, L. Palomba, E. Carloni
- 16.10 *Presentazione orale selezionata*
Meccanismi molecolari dell'apoptosi indotta da pirimetamina in linfociti t umani
A.M. Giammarioli, L. Gambardella, M. De Felice, A. Giovannetti, W. Malorni, M. Pierdominici
- 16.45 Intervallo
- 17.15 **Assemblea Sitox Aula Pocchiari**
- 20.00 Cena Sociale

Mercoledì, 8 febbraio 2006

GIORNATA: LA TOSSICOLOGIA CLINICA NEL PANORAMA SANITARIO ITALIANO ED EUROPEO

Referente scientifico: C. Locatelli

Prima Sessione Aula Bovet

RUOLI E ATTIVITÀ NEL SSN

Moderatori: D. Greco, A. Volpini

- 08.45 *Introduzione: la tossicologia clinica nel SSN*
C. Locatelli

- 09.00 *La tossicologia clinica delle dipendenze*
P. Nencini
- 09.15 *L'attività dei Centri Antiveleni vista dai CAV italiani: i dati*
F. Davanzo
- 09.30 *Centro antiveleni: è necessario, perché, per chi ?*
M.L. Farina
- 09.45 *Il CAV: servizio di sanità pubblica*
L. Signore
- 10.00 *I laboratori per analisi in urgenza*
P. Papa
- 10.15 *Laboratori e servizi di diagnostica specifici*
M.L. Colombo
- 10.35 *Le risorse italiane relative alla tossicologia clinica nel SSN*
A. Barelli
- 10.50 Intervallo
- 11.15 *Forze dell'Ordine e aspetti tossicologici*
Ufficiale NAS
- 11.30 *L'attività dei CAV per i DEA*
I. Casagrande
- 12.00 *Attività richieste dall'ISS*
R. Binetti

Seconda Sessione Aula Bovet

LA NORMATIVA ITALIANA ED EUROPEA

Moderatori: G. Leonardi, C. Mastrocola, G. Palumbo

- 12.15 *L'insegnamento universitario e la scuola di specializzazione in Italia*
L. Manzo
- 12.30 *Inquadramento normativo dell'attività di tossicologia clinica, dei centri antiveleni e dei laboratori di diagnostica in Italia e in EU*
P. Botti
- 12.45 *Aspetti medico-legali dell'attività dei Centri Antiveleni*
P. Danesino da confermare

13.15 Discussione

Tavola Rotonda Aula Bovet

**TOSSICOLOGIA CLINICA, CENTRI ANTIVELENI E LABORATORI
DI TOSSICOLOGIA ANALITICA: ATTIVITÀ UTILE NECESSARIA
NEL PANORAMA SANITARIO ITALIANO? PROSPETTIVE E GARANZIE
DI FUNZIONAMENTO NEL PRESENTE E NEL FUTURO DEL SSN**

Moderatori: **E. Chiesara, L. Manzo**

15.00 *Proposte SITOX – CAV al Ministero della Salute*
C. Locatelli

CAV e Regioni

Rappresentante di un Assessorato Regionale

Attività attese dal Ministero della Salute

D. Greco da confermare

*Principi di sviluppo delle specializzazioni e delle professioni nel SSN, con
riferimento alla tossicologia clinica*

C. Mastrocola, G. Leonardi da confermare

*La tossicologia clinica e i centri antiveneni nella programmazione sanitaria
italiana*

F. Palumbo da confermare

Ruoli e attività nelle maxiemergenze convenzionali e non

M. Di Gennaro da confermare

I Centri antiveneni italiani e l'UE

L. Vittozzi da confermare

17.30 Documento di programma

Giovedì, 9 febbraio 2006

Sessione Plenaria dedicata a Marvin S. Legator Aula Pocchiari

Moderatori: **G. Cantelli Forti, A. di Domenico**

09.00 *Metabolic and DNA repair polymorphisms and susceptibility to environmentally-
induced genetic damage: A tribute to Marvin S. Legator*
S.Z. Abdel-Raman

- 09.30 *Tossicità delle nanoparticelle*
A.M. Gatti
- 10.00 *Pharmaceuticals in the environment: a risk assessment perspective*
J. Tarazona
- 10.30 *Applicazioni di tossicogenomica e proteomica allo sviluppo preclinico del farmaco*
M. Venturi
- 11.00 Intervallo

Sesta Sessione Aula Pocchiari

ASPETTI REGOLATORI NELLO SVILUPPO DI NUOVE MOLECOLE

Moderatori: **C. Bernardi, A. Meneguz, M. Weber**

- 11.30 *Implementazione dell'approccio tossicogenomico nella valutazione della sicurezza del farmaco negli studi preclinici*
A. Chiusolo, P. Cristofori
- 11.45 *Disegno, utilizzo e predittività degli studi preliminari in specie non rodentrici nello sviluppo tossicologico dei farmaci*
D. Ciabini, A. Terron, G. Galassi, S. Raimondo
- 12.00 *Valutazione della tossicità in ratti giovani durante il periodo post-natale seguito da un periodo di recupero*
R. Cicalese, L. Valdoni, R. Sisti, J. Brightwell
- 12.15 *Uso e limiti della "no observed adverse effects level" nella valutazione del rischio negli studi preclinici durante lo sviluppo dei farmaci*
A. Terron, L. Moccia, S. Raimondo
- 12.30 *Valutazione preclinica dei radiofarmaci: considerazioni e proposte sulla draft guidance FDA*
S. Bussi, A. Morisetti
- 12.45 *Safety assessment di materiali e oggetti in contatto con gli alimenti: sistema italiano e europeo, stato dell'arte e nuove tendenze*
M.R. Milana

Sesta Sessione Aula Bovet

TOSSICOLOGIA CLINICA: INTOSSICAZIONI ACUTE E CENTRI ANTIVELENI

Moderatori: **A. Filippelli, L. Manzo**

- 11.30 *Arresto cardiaco da intossicazione acuta da oleandro: trattamento con pace maker esterno come ponte alla terapia antidotica con FAB*
P. Severgnini, C. Lanza, F. Rovera, F. Perlasca, A. Travaglia, F. Davanzo
- 11.40 *Ingestione accidentale di levotiroxina in età pediatrica*
V. Dimasi, T. Della Puppa, S. Manfrè, F. Davanzo
- 11.50 *Ingestione volontaria di carbamazepina: linea di condotta terapeutica*
A.J. Lepore
- 12.00 *Un caso raro d'intossicazione digitalica per via endovenosa*
A. Pignataro, J. Georgatos, C. Locatelli
- 12.10 *Vitamina K, errori..... terapeutici*
L. Faraoni, G. Bacis, M.L. Farina
- 12.20 *Reazione avversa grave da eparine: caso clinico*
F. Mattioli, S. Storace, A. Martelli
- 12.30 *Intossicazione acuta da olanzapina in pazienti schizofrenici*
F. Bugamelli, M.A. Saracino, R. Mandrioli, C. Petio, A. Koukopoulos, M.A. Raggi
- 12.40 *Studio osservazionale sugli eventi avversi in pronto soccorso della Regione Campania*
A. Capuano, F. Mazzeo, A. Avolio, L. Ferrante, M. Gallo, M. Illiano, M. Capuano, A. Filippelli, F. Rossi
- 12.50 *Aspetti registrativi e impiego clinico degli antidoti: analisi della situazione italiana*
R. Butera, C. Locatelli, V. Petrolini, D. Lonati, L. Manzo
- 13.00 *Verso un piano nazionale per la sorveglianza delle intossicazioni acute*
L. Settimi, F. Davanzo, L. Sodano, L. Vellucci
- 13.15 Presentazione Poster e Pranzo
- 14.15 **Sessione di discussione Poster e Premio Bronzetti Aula Pocchiarri**
Moderatori: P.G. Gervasi, M. Manno
- 15.15 **Tavola Rotonda Aula Pocchiarri**
L'ADEGUATEZZA DEGLI ATTUALI PROTOCOLLI DI VALUTAZIONE PER LA SICUREZZA DI SOSTANZE CHIMICHE E FARMACI
Moderatori: R. Castelnuovo (RAI-Radio Tre Scienza)
- 16.45 Conclusioni e Chiusura del Convegno

Lettura Magistrale

GENETIC POLYMORPHISM OF DRUG METABOLIZING ENZYMES: IMPLICATIONS FOR DRUG RESPONSE AND XENOBIOTIC TOXICITY

Ingelman-Sundberg M.

Division of Molecular Toxicology, IMM, Karolinska Institutet, Stockholm

Polymorphism of genes encoding drug metabolising enzymes is a major known genetic cause for the interindividual variability in drug toxicity and response and contributes to interindividual differences in susceptibility for environmental agents. Based on the occurrence of mutations in these genes, gene deletions and gene duplications, the populations can be divided into poor (PM), intermediate (IM), efficient (EM) or ultrarapid (UM) metabolisers. The PMs lack the enzyme in question, the IMs are heterozygous for a defect gene, the EMs have two functional alleles, whereas the UMs have multiple functional gene copies on a single allele. All enzymes participating in the metabolism of drugs in phase I (functionalization) and phase II, where the modified drugs are conjugated to water soluble end products usually excreted in the urine, are polymorphic. This genetic polymorphism can thus cause abolished, quantitatively or qualitatively altered or enhanced xenobiotic metabolism. The evolutionary basis for this variability is adaptation to the environment in the form of dietary habits and genetic drift, the founder effect. A major role of this polymorphism is seen for individual susceptibility to drug toxicity, where subjects lacking a particular enzyme can achieve too high plasma levels at ordinary dosage, and with respect to non response of drug treatment where UMs are overrepresented. It is my estimate that dose adjustment in relation to the genotype of the drug metabolising enzyme in question would decrease the incidence of adverse drug reactions by 10-20%. Adverse drug reactions (ADRs) cause 7% of all hospitalisation, about 100.000 deaths annually in the US and cost the society about equal amount of money as the drug treatment *per se*. An increasing number of drugs are pharmacogenetically labelled by FDA which can lead to increased frequency of individualized dosing and less ADRs. With respect to the influence of polymorphism to the interindividual differences in cancer and other toxicity mediated by environmental chemicals, the situation at present is less clear. The major phase I enzymes participating in the metabolic activation of precarcinogens like CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1 and CYP3A4 are surprisingly genetically well conserved in the populations and thus lack known functional polymorphism, in contrast to the major drug metabolizing enzymes CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6. Concerning CYP2A6, which is strongly polymorphic in particular in Asia, and active in the metabolism of nicotine and activation of several precarcinogens, several reports about increased risk for lung cancer have however been reported in the Japanese population among subject carrying two functional genes. Metaanalyses of polymorphism in Phase II enzymes like the glutathione transferases might indicate a slightly higher risk for cancer among subjects lacking particular forms although many inconsistent results in this field have been presented. The lecture will give a state of the art view of the field today with illustrations from toxicological and pharmacological perspectives

Sessione Plenaria Aula Pocchiari

**La sicurezza chimica:
innovazioni e nuove sfide**

Moderatori

G. Cantelli Forti, L. Gramiccioni

LA POLITICA DELLE SOSTANZE CHIMICHE: PASSATO PRESENTE E FUTURO

Di Prospero Fanghella P.

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,
Roma*

La normativa vigente in materia di sostanze chimiche. L'attuale sistema europeo per il controllo delle sostanze chimiche si basa sulle norme stabilite da quattro strumenti legislativi: la direttiva 67/548/EEC per la classificazione, l'imballaggio e l'etichettatura delle sostanze pericolose, la direttiva 99/45/EC per la classificazione, l'imballaggio e l'etichettatura dei preparati pericolosi, la direttiva 76/769/CEE che limita l'immissione sul mercato e l'uso di talune sostanze e preparati pericolosi, il regolamento del Consiglio 93/793/CEE sulla valutazione e gestione del rischio sostanze esistenti. Di fatto circa quaranta direttive e regolamenti che distinguono fra le sostanze di nuova immissione sul mercato e quelle già presenti alla data del 18 settembre 1981, creano un quadro normativo piuttosto complesso. Per le cosiddette "sostanze nuove", circa 3.000, è prevista l'effettuazione di saggi volti all'identificazione e alla valutazione dei rischi per l'uomo e l'ambiente connessi al loro uso, all'atto della notifica a seguito dell'immissione sul mercato a partire da quantità pari o superiori a 10 kg. Per le sostanze "esistenti", circa 100.000, ci si basa sulle informazioni disponibili e in particolare tra quelle ad alto volume di produzione (quantità superiori alle 1.000 t./anno) sono state individuate alcune liste prioritarie, per un totale di 140 sostanze, per effettuare una valutazione completa dei rischi per la salute umana e l'ambiente.

Sviluppi futuri. Per riformare le norme che regolano l'immissione sul mercato e l'uso delle sostanze chimiche e per armonizzare e rendere più efficaci gli attuali strumenti legislativi è stata presentata, dalla Commissione Europea, una proposta di regolamento chiamata REACH, cioè Registration, Evaluation, and Authorisation of Chemicals. Questo progetto è il risultato di un processo che ha avuto inizio con la pubblicazione il 27 febbraio del 2001 da parte della Commissione di un Libro Bianco sulla futura strategia politica per le sostanze chimiche. Il REACH dà una maggiore responsabilità all'Industria nel trattare il rischio connesso alle sostanze chimiche e nel fornire agli utilizzatori le informazioni necessarie per un uso sicuro. Nel periodo transitorio saranno ri-focalizzate tutte le attività con un lavoro preparatorio per il REACH sia da parte della Commissione sia degli Stati Membri con lo sviluppo delle linee guida necessarie e delle infrastrutture attraverso progetti di recepimento (RIP=Reach Implementation Projects) e attraverso accordi strategici con l'Industria per assicurare l'applicabilità dei vari meccanismi del REACH.

L'APPROCCIO DELL'AGENZIA EUROPEA PER LA SICUREZZA ALIMENTARE (EFSA) PER LA VALUTAZIONE DEI CANCEROGENI GENOTOSSICI

Crebelli R.

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,
Roma*

L'affinamento delle tecniche chimico-analitiche ha portato nel recente passato all'individuazione di un numero crescente di sostanze con caratteristiche cancerogene e genotossiche negli alimenti, il cui impatto sulla salute non è stato adeguatamente delucidato. La valutazione del rischio posto dalla esposizione a basse dosi di cancerogeni genotossici rappresenta infatti uno dei compiti più impegnativi in ambito tossicologico. Ciò in quanto nonostante i recenti progressi nella definizione dei meccanismi di cancerogenesi, le conoscenze attuali sono ancora insufficienti per permettere una rigorosa estrapolazione degli effetti osservati in condizioni sperimentali all'uomo. In considerazione di ciò l'Unione Europea ha finora evitato di adottare modelli quantitativi per la stima del rischio cancerogeno negli alimenti, limitandosi alla raccomandazione di perseguire il livello di esposizione più basso ragionevolmente ottenibile, indicato come ALARA (*As Low As Reasonably Achievable*). Sebbene l'approccio dell'ALARA sia in linea di principio adeguatamente cautelativo, escludendo livelli di esposizione intrinsecamente accettabili, esso non rappresenta uno strumento efficace per la gestione del rischio cancerogeno. L'uomo è infatti tipicamente esposto a molteplici agenti cancerogeni o sospetti tali, e ciò rende necessario individuare delle priorità per attivare eventuali azioni preventive. In considerazione di tale necessità, l'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha recentemente proposto un approccio armonizzato per la valutazione del rischio cancerogeno nei suoi comitati scientifici. L'approccio proposto prevede la definizione del margine di esposizione (MoE, *Margin of Exposure*) come parametro di confronto e di valutazione del rischio relativo posto da agenti cancerogeni diversi. Il MoE rappresenta il rapporto tra una appropriata dose di riferimento della curva dose-risposta e l'assunzione umana stimata. Come dose di riferimento l'EFSA raccomanda il limite inferiore dell'intervallo di confidenza della *benchmark dose* associata con una incidenza di tumori indotti del 10% (BMDL10). Questa viene confrontata con vari scenari di esposizione, permettendo di stabilire per ciascuno il MoE rispetto alla dose attiva di riferimento, e quindi la priorità per eventuali azioni correttive. Sebbene l'approccio dell'EFSA non permetta di definire una dose soglia, la cui esistenza è peraltro dibattuta, esso consente di definire un cut-off per sostanze con bassa priorità che verosimilmente presentano un rischio trascurabile. Questo cut-off corrisponde a un MoE uguale o superiore a 10.000, che incorpora fattori di incertezza relativi alle differenze inter- e intraspecifiche e all'estrapolazione dalla BMDL10. È importante sottolineare che l'approccio proposto dall'EFSA non sostituisce ma affianca l'ALARA, e che quindi la riduzione della esposizione ai cancerogeni genotossici deve essere realizzata, ove possibile, indipendentemente dal MoE. L'approccio proposto trova inoltre come principale campo d'applicazione la valutazione dei contaminanti presenti nei cibi, mentre non vuole rappresentare uno strumento per definire eventuali concentrazioni tollerabili di cancerogeni genotossici introdotti volontariamente, per esempio come residui di pesticidi, che rimangono banditi.

CONTAMINANTI ORGANICI PERSISTENTI E SALUTE UMANA: PROBLEMATICHE EMERGENTI

De Felip E.

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,
Roma*

Il gruppo dei contaminanti organici persistenti (*POPs*) include alcuni degli inquinanti tossici più studiati a livello espositivo e tossicologico (ad es. pesticidi organoclorurati) e già oggetto di regolamentazione a livello comunitario e internazionale. La valutazione del rischio per la salute umana associata agli attuali livelli di esposizione è però particolarmente complessa per quei *POPs*, come i policlorobifenili (*PCB*), costituiti da decine di diversi congeneri a differenziale, e non sempre adeguatamente caratterizzata, attività tossicologica. La presenza nel corpo umano di miscele complesse di questi congeneri costituisce un considerevole problema interpretativo a livello tossicologico, in particolare nei casi in cui si osserva una correlazione tra la “dose interna” di questi inquinanti e alcune patologie, quali l’endometriosi. L’aumento dei livelli di *PCB* che abbiamo osservato in donne affette da questa patologia riguarda infatti congeneri a diversa struttura (diossina- e non diossina-simili) e rende necessario considerare l’ampio spettro delle differenti attività e dei non del tutto caratterizzati meccanismi di azione pertinenti ai due gruppi di congeneri. Anche tra i “nuovi” *POPs* proposti per l’inclusione nei protocolli internazionali (*UNECE-LRTAP*, Convenzione di Stoccolma, etc.), quelli che presentano le maggiori difficoltà in termini di valutazione del rischio sono costituiti da famiglie di congeneri, come i polibromodifenileteri (*PBDE*), o da famiglie di composti tra loro strutturalmente correlati come il perfluorottansulfonato (*PFOS*) e i suoi precursori. Su queste sostanze, presenti nei tessuti umani in concentrazioni che sono aumentate nel tempo, è in corso di valutazione l’esposizione della popolazione generale, resa difficile dalla scarsità dei dati di sulla loro presenza negli alimenti. I dati tossicologici, disponibili solo per alcuni di questi congeneri/composti, ne evidenziano un’ampia gamma di effetti avversi (tra cui effetti sulla riproduzione e sullo sviluppo neurocomportamentale).

INTERAZIONI TRA XENOBIOTICI E VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI ESPOSIZIONI COMBinate: UNA SFIDA PER IL FUTURO

Testai E.

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nonostante l'esposizione combinata a un elevato numero di sostanze chimiche rappresenti una regola più che una eccezione, gli approcci convenzionali per la protezione della salute e dell'ambiente prevedono valutazioni del rischio di molecole singole. Negli ultimi anni l'attenzione per le esposizioni multiple è notevolmente cresciuta, ma a oggi il 95% delle risorse della ricerca tossicologica continua a concentrarsi su singoli composti. L'impossibilità di saggiare direttamente gli effetti di tutte le possibili combinazioni di xenobiotici evidenzia l'inadeguatezza dell'approccio tradizionale anche per miscele di origine ambientale, la cui composizione varia nel tempo. Perciò, partendo dalla conoscenza delle proprietà tossicologiche dei singoli componenti, la ricerca e le Autorità Regolatorie si sono progressivamente orientate allo sviluppo di approcci che potessero permettere una stima dei potenziali effetti dovuti a esposizioni combinate. Ne sono un esempio il TEF (Toxic Equivalency Factor), usato nella valutazione di miscele di composti diossina-simili e l'HI (Hazard Index), entrambi basati sul concetto di additività di dose (i diversi componenti si comportano come se rappresentassero diverse diluizioni dello stesso xenobiotico e producono lo stesso effetto, sullo stesso organo bersaglio, attraverso lo stesso meccanismo) o di risposta (l'effetto sullo stesso bersaglio è dato dalla somma dei singoli effetti, che possono essere prodotti da meccanismi indipendenti). Alla base della additività prevista da TEF e HI c'è il presupposto improbabile che non esistano interazioni (sinergiche e/o antagoniste) tra i componenti della miscela e comunque vari esempi dimostrano come lo stesso meccanismo di azione non sia predittivo di additività, ma è necessario considerare i relativi parametri tossicocinetici. Sulla base di adeguate evidenze sperimentali (WoE, Weight of Evidence), è possibile modificare il calcolo di HI, introducendo un fattore che rappresenti una stima qualitativa (o semi-quantitativa) dell'interazione osservata. È stato proposto che si possa arrivare a una valutazione quantitativa dell'interazione attraverso l'uso di modelli matematici tra cui i PBPK (la maggior parte delle interazioni è di natura tossicocinetica), ma i dati sperimentali disponibili per i modelli sono ancora molto limitati. Nella presentazione verranno illustrati gli approcci di valutazione esistenti, i loro limiti e alcuni esempi di studi di interazione allo scopo di mostrare che, per ridurre le incertezze inerenti gli approcci raccomandati dalle agenzie internazionali (EPA, ATSDR), è necessario condurre ricerche di tipo meccanicistico, includendo anche l'uso di tecnologie "high-through-put", su combinazioni di sostanze ritenute prioritarie per la loro effettiva presenza/frequenza di esposizione della popolazione o la potenziale pericolosità, a dosi che siano rappresentative delle condizioni di esposizione reale.

SOSTANZE CANCEROGENE E THRESHOLD OF TOXICOLOGICAL CONCERN (TTC)

Galli C.L.

Laboratorio di Tossicologia e Centro d'Eccellenza per le Malattie Neurodegenerative, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

La Threshold of Toxicological Concern (TTC) è un principio che prevede la possibilità di stabilire per tutti i prodotti chimici un valore soglia di esposizione per l'uomo al di sotto del quale non sono attesi rischi per la salute. Il concetto che soglie di esposizione possano essere identificate nella dieta, per singoli prodotti chimici il cui profilo tossicologico è noto, è già ampiamente utilizzato in pratica da molte autorità regolatorie per fissare i valori di assunzioni giornaliere accettabili ("acceptable daily intakes" ADIs). Tuttavia il concetto di TTC amplia questa possibilità proponendo che possa essere identificato per ogni prodotto chimico, compresi quelli la cui tossicità non è nota, un valore minimo sulla base della loro struttura chimica. Questo concetto è la base scientifica per la valutazione degli additivi da parte della FDA (US Food and Drug Administration, 1995 Threshold of Regulation for indirect food additives). I principi TTC sono stati adottati anche Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) per la valutazione degli aromatizzanti. Lo stabilire un principio di TTC universalmente accettato favorisce il beneficio di consumatori, industria e regolatori. Il precludere il ricorso a studi tossicologici e estesi, per quei prodotti la cui assunzione rimane sotto tale soglia, permetterebbe infatti di indirizzare più risorse, sia in termini di esperienza, tempo e denaro, sul saggiare e valutare sostanze con grandi potenzialità di porre rischi per la salute umana, e contribuire a ridurre il numero di animali da usare in tali sperimentazioni. In generale c'è una consistente aspettativa che i database disponibili siano sufficienti per guidare la determinazione di TTC. Ulteriori sforzi saranno necessari per studiare aspetti particolari, a esempio l'immunotossicità e l'allergenicità, per cui solo dati limitati sono disponibili. Per la tossicità endocrina, sono già in corso studi la cui valutazione permetterà di trarre conclusioni sugli attuali valori soglia. Probabilmente sulla base di tali dati, appare più adeguato considerare un range di valori di TTC piuttosto che un singolo valore. L'uso del concetto TTC a scopi regolatori dovrà essere accompagnato da un affinamento della valutazione dell'esposizione.

Portale Tox

THE WORLD LIBRARY OF TOXICOLOGY IL PORTALE MONDIALE DI TOSSICOLOGIA

Marinovich M.¹, Della Seta M.², Calicchia M.C.²

¹*Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano;* ²*Settore Documentazione, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La World Library of Toxicology è un portale Internet che dà accesso a una collezione di informazioni integrate in formato elettronico, realizzato dalla National Library of Medicine statunitense, Division of Specialized Information Services, Toxicology and Environmental Health Information Program con il contributo del Fogarty International Center dei National Institutes of Health. Argomento di questa raccolta è la tossicologia, la sicurezza dei prodotti chimici, la salute ambientale e campi assimilabili come la salute e la sicurezza in ambito occupazionale, la valutazione del rischio e le radiazioni. L'informazione è organizzata su base nazionale, multi-nazionale, continentale e internazionale. Fra i vantaggi che sicuramente deriveranno dalla diffusione al pubblico di questo portale si possono ricordare: una maggiore conoscenza per i tossicologi delle attività dei colleghi operanti in altri Paesi e a livello sopranazionale; la catalizzazione di progetti collaborativi e la possibilità di evitare duplicati nella ricerca; la costituzione di un punto di riferimento nazionale per la costruzione e il mantenimento dei vari siti nazionali. Inoltre i tossicologi dei Paesi in via di sviluppo potranno meglio usufruire di esperienze già fatte nei Paesi tecnologicamente più avanzati. Il sito è interrogabile non solo tramite parole chiave, (ad esempio "endocrine disrupters"), come avviene per qualsiasi banca dati o motore di ricerca, ma anche mediante il nome del Paese o del continente, o di organizzazioni specifiche (ad esempio IARC, ecc.) Nello schema attuale di organizzazione dell'informazione, la scheda relativa a ogni nazione si apre con le istituzioni governative, non governative e accademiche in cui si svolgono programmi e ricerche di tossicologia. Segue poi una sezione dedicata alla legislazione operante in ogni paese in ambito tossicologico, la segnalazione degli International MEDLARS Centers (per l'Italia l'ISS, Roma), dell'IFCS Focal point (Ministero della Salute) e i riferimenti bibliografici presenti nella base dati TOXLINE relativi a ogni nazione. Ancora da costruire è l'informazione relativa alla didattica, chi insegna cosa e dove nell'ambito tossicologico, possibili scambi e accessi per studenti e postdoc sempre in ambito tossicologico. La SITOX e il Settore Documentazione dell'ISS, che collaborano per l'Italia a questo progetto, sono pronti a recepire qualsiasi suggerimento/consiglio per migliorare il sito e renderlo più appetibile, o per segnalare attività al di fuori dell'ambito societario ma pur sempre tossicologiche.

Prima Sessione Aula Pocchiari
Tossicità d'organo

Moderatori
E. Chiesara, P. Preziosi

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN NUOVO MODELLO SPERIMENTALE DI ARITMIA INDOTTA DA OUABAINA NEL RATTO ANESTETIZZATO

Cometa M.F.¹, Campolongo P.², Trezza V.², Palmery M.²

¹*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ²*Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

Nonostante il ratto venga considerato un modello animale ideale per gli studi in campo cardiovascolare, il suo utilizzo in studi di elettrofisiologia cardiaca è limitato a modelli sperimentali abbastanza complessi e invasivi. Di conseguenza, vista la carenza di dati presenti in letteratura, lo scopo del nostro lavoro è stato quello di elaborare un nuovo, semplice modello sperimentale di aritmia indotta da ouabaina in ratti Wistar, concepito in modo tale da permettere di valutare sia le capacità di protezione che di reversione esercitate da sostanze con potenziale attività antiaritmica. Per valutare in maniera chiara la progressiva insorgenza della fibrillazione atriale e poi di quella ventricolare, abbiamo somministrato ouabaina (0,01, 0,15 e 0,3 mg kg⁻¹ min⁻¹) attraverso la vena giugulare sinistra dell'animale con una pompa da infusione. Abbiamo, quindi, convalidato il modello sperimentale valutando la sua sensibilità agli effetti farmacologici di alcuni tra i più rappresentativi farmaci appartenenti alle quattro classi di antiaritmici di Vaughan Williams. In particolare, abbiamo somministrato lidocaina, DL-propranololo, DL-sotalolo e verapamil attraverso la vena giugulare destra degli animali sia due minuti prima dell'inizio dell'infusione di ouabaina (tecnica di protezione), sia 10 minuti dopo l'insorgenza di un'aritmia stabile (tecnica di reversione). La ouabaina, alla dose di 0,15 mg kg⁻¹ min⁻¹, ha determinato la progressiva insorgenza di fibrillazione atriale, prima, e ventricolare, successivamente. Di conseguenza, utilizzando questa "dose aritmogena ideale", abbiamo convalidato il modello sperimentale, sia nella tecnica di prevenzione che in quella di reversione. Nel complesso, i risultati che abbiamo acquisito mostrano che l'aritmia indotta da ouabaina nel ratto è molto sensibile agli effetti farmacologici dei farmaci antiaritmici delle quattro classi di Vaughan Williams e questo fornisce una buona convalida per l'ulteriore impiego sperimentale del modello. Tali risultati, inoltre, indicano che questo nuovo modello sperimentale potrebbe risultare molto utile nella selezione o nella caratterizzazione farmacologica di nuovi potenziali farmaci con attività antiaritmica e nello studio della elettrofisiologia cardiaca.

L'ATTIVITÀ DELLA PARG MEDIA IL DANNO INTESTINALE INDOTTO DA OCCLUSIONE E RIPERFUSIONE DELL'ARTERIA SPLANCNICA

Cuzzocrea S.¹, Di Paola R.¹, Mazzon E.¹, Cortes U.², Genovese T.¹, Muià C.¹, Li W.³, Xu W.³, Li J.H.⁴, Zhang J.³, Wang Z.Q.²

¹*Dipartimento Clinico e Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Torre Biologica, Policlinico Universitario, Messina;* ²*International Agency for Research on Cancer, Lyon;* ³*Guilford Pharmaceuticals Inc., Baltimore;* ⁴*Lilium Pharmaceuticals, Cockeysville*

La poly (ADP-ribosyl)azione, una modificazione post-traduzionale precoce in risposta al danno al DNA, è catalizzata dalla poly (ADP-ribose) polimerasi (PARP-1) e catabolizzata dalla poly (ADP-ribose) glicoidrolasi (PARG). Lo scopo di questo studio è stato quello di investigare il ruolo della PARG sulla modulazione della risposta infiammatoria causata da ischemia e riperfusione splancnica. SAO shock nei ratti così come in topi wild-type (WT) è associato a una significativa infiltrazione neutrofilica nell'ileo e a una produzione di TNF- α (tumor necrosis factor-alpha). Sezioni di tessuto di ileo prelevati da topi WT così come da ratti aventi subito SAO shock e riperfusi, mostravano colorazione positiva verso P-selectina e ICAM-1 che era maggiormente localizzata nelle cellule dell'endotelio vascolare. La distruzione genetica del gene per PARG nel topo o l'inibizione farmacologica di PARG tramite inibitori di PARG migliorava significativamente lo stato istologico dei tessuti riperfusi, cosa che era associata con la riduzione dell'espressione di P-selectina e ICAM-1, dell'infiltrazione neutrofilica nell'intestino riperfuso, e con la produzione di TNF- α . Questi risultati suggeriscono che l'attività della PARG modula la risposta infiammatoria nell'ischemia/riperfusione e partecipa infine (obiettivo) ai danni dell'organo in queste condizioni.

RUOLO DEI LIGANDI ENDOGENI ED ESOGENI PER PPAR- α (PEROXISOME PROLIFERATORS ACTIVATED RECEPTORS ALPHA) NELLO SVILUPPO DEL DANNO POLMONARE INDOTTO DA BLEOMICINA

Genovese T., Mazzon E., Di Paola R., Muià C., Crisafulli C., Caputi A.P., Cuzzocrea S.
*Dipartimento Clinico e Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Facoltà di Medicina,
Università degli Studi di Messina, Torre Biologica, Policlinico Universitario, Messina*

I PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) sono membri della superfamiglia dei fattori di trascrizione ligando-dipendenti che sono correlati con i recettori degli ormoni steroidei e tiroidei e dei retinoidi. Lo scopo del presente studio è stato quello di esaminare gli effetti dei ligandi endogeni ed esogeni per PPAR- α sullo sviluppo del danno polmonare causato dalla somministrazione di bleomicina. Il danno polmonare è stato indotto in topi PPAR- α wild-type (WT) e in topi PPAR- α knock out (PPAR- α KO), provenienti dalla Jackson Laboratories (Harlan Nossan, Milan, Italy), tramite somministrazione intratracheale di bleomicina. Nei polmoni dei topi PPAR- α WT trattati con bleomicina è stata osservato un aumento dell'immunoreattività verso poly-ADP-ribose, TNF- α e IL-1 β , così come una significativa perdita di peso corporeo e mortalità. L'assenza del gene funzionale per PPAR- α nei topi PPAR- α KO causa un significativo aumento di tutti i parametri precedentemente descritti. Al contrario, il trattamento dei PPAR- α WT con WY 14643 (1 mg/kg al giorno) riduceva significativamente: (i) il grado di danno polmonare, (ii) l'aumento dell'attività mieloperossidasi (MPO), (iii) l'aumento nella colorazione (immunoistochimica) per poly-ADP-ribose, TNF- α e IL-1 β causata dalla somministrazione di bleomicina. Così, i ligandi endogeni ed esogeni per PPAR- α riducono il grado di danno polmonare indotto da bleomicina nel topo. In più, proponiamo che i ligandi di PPAR- α potrebbero essere utili nel trattamento del danno polmonare.

CARDIOVASCULAR SAFETY PHARMACOLOGY: UN APPROCCIO INTEGRATO

Morisetti A., Bussi S.

Bracco Imaging SpA, Centro Ricerche Milano, Pharmatox Development, Milano

La farmacologia preclinica di sicurezza richiesta dalle normative internazionali (ICH S7A) include la determinazione degli effetti sul sistema cardiovascolare, in particolare per quanto riguarda il prolungamento del QT (ICH S7B). Dal momento che queste determinazioni possono essere realizzate solo su animali di media taglia, considerazioni etiche ed economiche inducono all'ottimizzazione del numero di animali da impiegare, ottenendo il massimo delle informazioni (refinement, reduction). Nello sviluppo di un mezzo di contrasto iniettabile per risonanza magnetica (MultiHance, gadobenate dimeglumine) abbiamo sottoposto a FDA un disegno sperimentale nel non roditore (scimmia) basato su un trattamento cross-over, che includeva 3 livelli di dosaggio con il test article, 1 trattamento con reference compound, 1 trattamento con il controllo. L'esperimento (GLP compliant) includeva tre animali per sesso precedentemente impiantati con un sistema di telemetria e si estendeva su 13 giorni, con 2 giorni di washout tra i diversi trattamenti, giustificato sulla base di dati di eliminazione di MultiHance nella stessa specie. Oltre a mortalità e segni clinici sono stati registrati (o calcolati) i seguenti parametri: pressione arteriosa media, sistolica e diastolica, frequenza cardiaca; ECG: durata complesso QRS, intervallo PR, RR, QT (QTc sec. Bazett e Fredricia). Gli animali non sono stati sacrificati la termine delle procedure. L'ente regolatorio americano apprezzava il disegno sperimentale richiedendo tuttavia l'inserimento di un gruppo controllo positivo per la verifica del sistema. Tale gruppo non è stato inserito sia per motivi etici, sia perché avrebbe invalidato il disegno crossover. Anche la guideline specifica ICH S7B non ravvede la necessità di un controllo positivo in ogni esperimento. Il sistema come tale (animale in telemetria) è stato ampiamente validato in letteratura e la conduzione dello studio secondo gli standard di qualità (GLP) garantisce la veridicità dei risultati. FDA ha accettato queste motivazioni. Lo studio ha messo in luce la safety cardiovascolare di MultiHance fino alla massima dose testata, corrispondente a circa 60 volte la dose efficace nell'uomo. Questo studio dimostra che, utilizzando un disegno sperimentale *ad hoc* rispetto al prodotto, è possibile integrare senso scientifico, applicazione delle guidelines e risparmio di animali.

IL PROLUNGAMENTO DELL'INTERVALLO QT: AZIONI E REAZIONI

Bertini Malgarini R.¹, Meneguz A.², Tucci P.³, Pimpinella G.¹

¹*Agenzia Italiana del Farmaco*; ²*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità*,

³*Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

La maggior parte dei ritiri dal commercio di medicinali nel decennio 1995-2005 è avvenuto a causa del loro effetto sull'intervallo QT. I casi più eclatanti hanno riguardato: terfenadina, astemizolo, cisapride, sertindolo, grepafloxacina, tioridazina, levacetilmetadolo. Un numero così elevato di ritiri, sempre per lo stesso problema, evidenzia che anche nei casi in cui il prolungamento dell'intervallo QT è stato studiato nella fase pre-registrativa, non sono stati adeguatamente messi in luce i reali punti critici. Quindi, l'approccio metodologico finora utilizzato presenta delle carenze che non permettono di generare dati di qualità tale da essere sufficientemente predittivi. Anche se con lentezza, l'ICH (International Conference on Harmonisation), organismo internazionale preposto all'armonizzazione delle linee direttrici nel campo farmaceutico, per mettere in evidenza il problema in fase pre-marketing, ha finalmente emesso due nuove linee guida recepite ora dalle autorità regolatorie, una per la fase pre-clinica e una per la fase clinica. Il concetto che viene sottolineato è che le due linee guida, non a caso approvate contemporaneamente, vanno comprese e utilizzate insieme. È chiaro che valutazioni di tale complessità sono legate a un margine di incertezza e soggettività che nessuna linea guida può ridurre a zero, ma la cui minimizzazione passa obbligatoriamente attraverso un approccio integrato. Leggere i dati tossicologici senza tener conto dei dati già disponibili nell'uomo e dei segnali di sicurezza già emersi nell'uso clinico inficia totalmente la valutazione. D'altro canto, disegnare i trials clinici senza tenere conto di quanto emerso dagli studi tossicologici, può far omettere controlli fondamentali e far emergere in fase post-marketing eventi inattesi che potevano essere prevenuti. Lo scopo finale delle nuove linee guida è valutare, per una specifica molecola, se essa presenti o meno un rischio legato al prolungamento dell'intervallo QT e, in tal caso, individuare gli elementi sui quali basare la valutazione della rilevanza dell'effetto proaritmico, quali l'effetto sui canali ionici, le modificazioni elettrocardiografiche nell'uomo, i casi di reazione avversa pre e post-marketing. Entrambe le linee guida tendono a suggerire una metodologia, più che a dare indicazioni pedissequae. Funzioneranno? In realtà, esse hanno standardizzato e armonizzato le procedure che venivano già applicate in maniera non sistematica. Soprattutto, hanno fornito i criteri per formulare un'ipotesi di lavoro che sia preventiva dei possibili eventi avversi. La loro efficacia dipenderà strettamente sia dall'integrazione delle informazioni cliniche e non cliniche, sia dal continuo aggiornamento e dalla formazione specifica degli operatori del settore sulla loro interpretazione e applicazione.

EFFETTI DELL'OSSIGENOTERAPIA IPERBARICA SULLA CASCATA COAGULATIVA IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI SINDROME DA INSUFFICIENZA MULTIORGANO

Imperatore F¹, Filippelli W.¹, De Lucia D.², Liguori G.¹, Sessa M.², Luongo C.³, Lambiase L.¹, Capuano M., Rinaldi B.¹, Filippelli A.¹, Rossi F.¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Farmacologia L. Donatelli, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli; ²Laboratorio di Emostasi e Trombosi, Facoltà di Medicina, Seconda Università degli Studi di Napoli; ³Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Anestesiologiche e dell'Emergenza, Seconda Università degli Studi di Napoli

La sindrome da disfunzione multiorgano (MODS) è la principale causa di morte nelle Unità di Terapia Intensiva (UTI) non coronarica. Alcuni studi hanno dimostrato che le alterazioni emocoagulative giocano un ruolo chiave nella patogenesi della MODS. Nostri precedenti studi hanno dimostrato l'efficacia dell'ossigenoterapia iperbarica (OTI) nel trattamento di modelli sperimentali di MODS. Scopo del presente studio è stato valutare gli effetti dell'OTI sulla cascata coagulativa durante un modello sperimentale di MODS. 40 ratti maschi sono stati suddivisi in quattro gruppi da 10. Il primo gruppo è stato trattato con soluzione salina 0,9%; il secondo con zymosan 500 mg/kg; il terzo gruppo è stato trattato con OTI a 2 atmosfere assolute (AT.A.) alla 4° e 11° ora dall'inizio dello studio, mentre il quarto gruppo è stato trattato con zymosan e OTI. Dopo 18 ore dall'inizio dello studio gli animali sono stati sacrificati e sono stati valutati il tempo di protrombina (PT), il tempo di tromboplastina parziale attivata (apTT), i livelli plasmatici di fibrinogeno. Sono stati inoltre valutati l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), l'inibitore 1 dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1), l'antigene di von Willebrand (vWF) e il D-Dimero (XDP). La somministrazione intraperitoneale di zymosan è responsabile della MODS, caratterizzata da alterazioni emocoagulative, quali l'aumento statisticamente significativo rispetto ai controlli dei livelli plasmatici di FIB, t-PA, PAI-1 e degli XDP ($p < 0,01$). Inoltre la MODS indotta da zymosan è caratterizzata da un aumento significativo dei livelli plasmatici dell'antigene di vWF ($p < 0,01$). L'OTI riduce significativamente le alterazioni emocoagulative indotte da zymosan ($p < 0,01$). Il trattamento iperbarico da solo non interferisce con la cascata coagulativa. I nostri risultati dimostrano che lo stato ipercoagulativo indotto dal zymosan è associato alla disfunzione endoteliale e contribuisce allo sviluppo della MODS. Inoltre, i nostri dati confermano che l'efficacia dell'OTI nel trattamento della MODS, attraverso una riduzione dello stato ipercoagulativo e della disfunzione endoteliale.

Prima Sessione Aula Bovet
Xenobiotici e rischio cancerogeno

Moderatori
A. Carere, M.E. Fracasso

CANCEROGENESI E GENOTOSSICITÀ DEL FURANO

Carere A.

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel maggio del 2004 la FDA (USA) annunciò il ritrovamento del furano, potente cancerogeno sperimentale, in una grande varietà di prodotti alimentari che avevano subito trattamento termico. Il furano è stato trovato, fino a 125 µg/kg, in prodotti quali caffè, salse, alimenti in scatola o in vasetti contenenti carne o vegetali, compresi quelli per l'infanzia. Sul furano, nel dicembre 2004, l'EFSA ha pubblicato sul suo sito web un rapporto tecnico: (http://www.efsa.eu.int/science/contam_scientific_documents/catindex_en.html). Il furano è un composto volatile facilmente assorbito dai polmoni o dall'intestino e rapidamente metabolizzato, da parte del citocromo P450 CYP2E1, in un composto molto reattivo, la di-aldeide, cis-2-butene-4-dial. Il furano è un potente induttore di colangiocarcinomi epatici nel ratto anche alla dose più bassa saggiata (2mg/kg p.c./di per 5 giorni a settimana), oltre ad adenomi e carcinomi epatici e leucemie mononucleari. Nel topo induce adenomi e carcinomi epatici. Un punto critico per la valutazione del rischio e per fini regolatori è se il furano sia o non sia un cancerogeno genotossico. Il meccanismo di azione cancerogena non è ancora stato chiarito in modo definitivo. Al riguardo sono state formulate ipotesi sia di azione indiretta (proliferazione epatocellulare secondaria alla citotossicità) che diretta (genotossica). L'evidenza attuale, che sembra favorire, almeno in parte, il meccanismo genotossico è la seguente: i) il furano induce mutazioni geniche, aberrazioni cromosomiche, SCE e rotture a doppio filamento del DNA in cellule di mammifero *in vitro*, e aberrazioni cromosomiche *in vivo*; ii) la di-aldeide induce mutazioni geniche nel ceppo TA104 di *S. typhimurium*, rotture a singolo filamento del DNA in cellule di mammifero e addotti al DNA *in vitro*.

FRAMMENTAZIONE DEL DNA INDOTTA IN CELLULE DI POLMONE DI RATTO E UMANE DA CINQUE COMPOSTI CHIMICI CANCEROGENI PER IL POLMONE DI RATTO

Baroni D., Robbiano L.

Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Clinica, Università degli Studi di Genova

Due difficoltà che si incontrano nella valutazione del rischio cancerogeno sono l'identificazione di composti tessuto-specifici e l'estrapolazione all'uomo dei risultati ottenuti nei roditori. Al fine di validare modelli sperimentali idonei a risolvere tali difficoltà, 5 composti che provocano nel ratto tumori del polmone – N-nitrosodimetilamina (NDMA), idrazina (IZ), cadmio solfato (CD), 4,4'-metilenbis(2-cloroanilina) (MOCA) e tetranitrometano (TNM) – sono stati esaminati per la loro capacità di indurre frammentazione del DNA in colture primarie di cellule polmonari di ratto e umane, e *in vivo* nel polmone del ratto. Utilizzando il "Comet assay", un incremento significativo e dose-dipendente della frequenza di rotture della singola elica del DNA e di siti alcali labili è stata riscontrata nelle cellule polmonari sia di ratto che umane esposte a una serie di concentrazioni sub-tossiche dei 5 composti. Alle concentrazioni più elevate i rapporti trattati/controlli delle frequenze medie di lesioni del DNA, valutate in base alla lunghezza della coda, sono risultati nelle cellule polmonari di ratto/e umane i seguenti: NDMA 10 mM, 4,9/3,2; IZ 4 mM, 4,3/3,2; CD 62 micromolare, 3,5/4,1; MOCA 31 micromolare, 2,5/5,1; TNM 16 micromolare, 1,8/2,8. Pertanto la potenza DNA lesiva risulta, sia pure in misura limitata, maggiore nelle cellule polmonari di ratto per NDMA e IZ, e in quelle umane per CD, MOCA e TNM. In accordo con questi risultati, un aumento statisticamente significativo nella frequenza media di lesioni del DNA è stato riscontrato nel polmone di ratti trattati per via orale con una dose singola ($\frac{1}{2}$ della DL50) dei 5 composti; in questo caso, i rapporti trattati/controlli sono risultati i seguenti: NDMA 3,4; IZ 2,8; CD 3,7; MOCA 2,7; TNM 2,2. La capacità della prova *in vivo* di identificare cancerogeni tessuto-specifici è inoltre dimostrata dall'assenza di lesioni del DNA nel fegato e nel rene dei ratti trattati con TNM che provoca solo tumori del polmone, mentre in accordo con i risultati degli studi di cancerogenesi esse erano presenti nel fegato e nel rene di ratti trattati con NDMA, e nel fegato di quelli trattati con IZ. I risultati di questo studio indicano, da un lato che i composti che provocano tumori del polmone possono essere identificati dal "Comet assay", e dall'altro che i 5 composti esaminati potrebbero causare tumori polmonari nell'uomo in quanto producono nelle cellule di polmone umano una frequenza di lesioni del DNA simile a quella osservata nelle cellule di polmone di ratto.

CONSIDERAZIONI SULL'INCAPACITÀ DELLA BATTERIA STANDARD DEI TEST DI GENOTOSSICITÀ DI IDENTIFICARE ALCUNI CANCEROGENI GENOTOSSICI

Martelli A., Brambilla G.

*Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Clinica,
Università degli Studi di Genova*

Nel 4th International Workshop on Genotoxicity Tests che si è svolto nello scorso settembre a San Francisco una sessione, coordinata dalla dottoressa Anita Bigger della Food and Drug Administration, era dedicata alle modificazioni dei sistemi di attivazione metabolica che dovrebbero essere introdotte nei test *in vitro*, ed ha preso lo spunto da una nostra recente che è stata illustrata dalla stessa Bigger. In breve, questa review, tramite una serie di esempi, mette in evidenza che la mancata identificazione di alcuni cancerogeni genotossici è dovuta soprattutto alle seguenti cause: nei test *in vitro*, a) al fatto che il sistema di attivazione metabolica esogeno costituito da S-9 mix di fegato di ratto riproduce solo parzialmente quanto avviene *in vivo*, b) alla differente biotrasformazione dei composti chimici che può verificarsi in cellule di diversi tessuti e di diverse specie animali; nei test *in vivo*, a) al comportamento farmacocinetico del composto in esame e b) alla sua possibile specie-, sesso-, e tessuto-specificità. Le interessanti informazioni fornite dalle successive comunicazioni sono, in sintesi, le seguenti. L' 1-2% dei farmaci è biotrasformato nell'uomo per almeno il 10% in metaboliti presenti nei roditori solo in tracce, o in metaboliti che nei roditori non si formano affatto. Poiché ciò è rivelato solo da indagini sul metabolismo nell'uomo, tali studi devono essere effettuati il più presto possibile. Se la sintesi dei sopradetti metaboliti è possibile, il loro effetto tossico dovrebbe essere valutato, specie in presenza di "structural alerts" sia nei test a breve termine che in quelli di cancerogenesi. In caso contrario, l'identificazione di un loro effetto genotossico potrebbe essere facilitata dall'impiego di: S9 da tessuti diversi dal fegato, in quanto il metabolismo del farmaco può essere extraepatico; S9 da fegato umano, che nel 25% dei casi si è rivelato più idoneo di quello da ratto nell'evidenziare un effetto mutageno; colture primarie di epatociti umani; batteri geneticamente modificati o altri sistemi umanizzati. Gli endpoint consigliati sono: danno del DNA, formazione di micronuclei, e mutazioni in cellule di mammifero.

EFFETTO GENOTOSSICO DI ALCUNI CALCIO ANTAGONISTI E DEI LORO NITROSODERIVATI

Gosmar M., Manfredi V., Garbero C., Trucco N., Martelli A.
*Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Clinica,
Università degli Studi di Genova*

Una nostra comunicazione presentata a questo congresso mette in evidenza che i dati disponibili sugli effetti genotossici e cancerogeni degli antiipertensivi, e fra questi dei calcio antagonisti, sono in diversi casi insufficienti per una valutazione attendibile del rischio cancerogeno per l'uomo. Riteniamo quindi interessante fornire i primi risultati di due diverse indagini condotte nell'ambito di uno studio su una serie di calcio antagonisti: la valutazione dell'effetto clastogeno, e quella della eventuale nitrosazione endogena a nitrosocomposti DNA-lesivi, teoricamente possibili per molecole come quelle dei calcio antagonisti che contengono gruppi amminici. L'effetto clastogeno è stato esaminato determinando la frequenza di eritrociti policromatici micronucleati nel midollo osseo di topi maschi trattati per via orale al tempo 0 e dopo 24 ore con $\frac{1}{2}$ DL50, e sacrificati per il prelievo del midollo a 24 ore dalla seconda dose. Un aumento rispetto ai controlli della frequenza di eritrociti micronucleati è stato osservato con 4 dei 7 farmaci esaminati: diltiazem +242%, nicardipina +157%, nifedipina +111%, lercanidipina +89%. Amlodipina, nitrendipina e verapamil sono risultati privi di effetto clastogeno. L'etilnitrosourea, utilizzata come controllo positivo alla dose i.p. di 100 mg/kg, ha provocato un aumento degli eritrociti micronucleati del 2250%. L'effetto DNA lesivo provocato nel fegato dalla nitrosazione intragastrica di alcuni calcio antagonisti è stato valutato in ratti maschi trattati per via orale con $\frac{1}{2}$ DL50 del farmaco in esame e 80 mg/kg di sodio nitrito. Al fine di ridurre il pH gastrico a 1,5- 2 i ratti sono stati alimentati per 60 ore unicamente con soluzione al 10% di saccarosio e iniettati s.c. con 10 mg/kg di istamina 30 minuti prima del trattamento. La frequenza di rotture della singola elica del DNA e di siti alcali-labili è stata misurata con il Comet Assay (lunghezza della coda). Rispetto ai controlli che ricevevano solo il farmaco, nei ratti trattati con calcio antagonista + sodio nitrito si sono riscontrati i seguenti aumenti della frequenza media di lesioni del DNA: nifedipina + 117%, nitrendipina + 111%, nicardipina + 60%, verapamil + 30%; per la nimodipina risultati preliminari indicano che l'aumento potrebbe essere dell'ordine di + 500%. Con la dimetilamina, che in presenza di nitrito genera il noto epatocancerogeno N-nitrosodimetilamina, l'incremento delle lesioni del DNA è risultato del 1980%. In conclusione, questi primi risultati indicano che alcuni calcio antagonisti esercitano un modesto ma non trascurabile effetto clastogeno, ed è possibile che alcuni farmaci di questa classe vengano nitrosati nello stomaco in nitrosocomposti genotossici.

FOCI PRIVI DI MUCINE (MDF) COME BIOMARCATORI DELLA CANCEROGENESI COLICA IN RATTI INDOTTI COL CANCEROGENO COLON SPECIFICO 1,2 DIMETILIDRAZINA

Femia A.P., Salvadori M., Dolara P., Bottini C., Tessitore L., Caderni G.
Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi di Firenze

Recentemente, abbiamo descritto nel colon di ratti trattati con cancerogeni colon specifici, foci di cripte con produzione difettiva di muco (mucin depleted foci-MDF). Gli MDF sono displastici e, in animali trattati con promotori della cancerogenesi, o, al contrario, con agenti chemiopreventivi, sono correlati alla cancerogenesi. Inoltre gli MDF mostrano marcate alterazioni nella via di segnalazione della β -catenina, una proteina implicata nell'adesione cellulare, ma anche un membro della via di segnalazione Wnt coinvolta nella cancerogenesi colica. Sulla base di questi risultati abbiamo ipotizzato che gli MDF siano lesioni preneoplastiche e che possano essere usati come biomarcatori della cancerogenesi colica. Per confermare ulteriormente questa ipotesi, abbiamo determinato gli MDF in ratti indotti con 1,2-dimetilidrazina (DMH) e trattati con polietilene glicole (PEG), un noto inibitore della cancerogenesi colica sperimentale. Ratti F344 trattati con 2 iniezioni s.c di DMH (150 mg/kg) sono stati suddivisi in: 1) controlli: nutriti con una dieta AIN-76 e acqua ad libitum e 2) PEG: alimentati con la stessa dieta ma che ricevevano nell'acqua da bere 5% di PEG. Sedici settimane dopo, il numero degli MDF era drasticamente ridotto ($P < 0,01$) nei ratti trattati con PEG (MDF/ colon: $5,2 \pm 0,8$ nei controlli e $0,1 \pm 0,1$ nel gruppo con PEG, medie \pm SE). Dal momento che il PEG è noto ridurre l'insorgenza di cancro del colon (3), questi risultati dimostrano che gli MDF sono lesioni correlate con la cancerogenesi che possono essere proposti come endpoints per studiare la modulazione della cancerogenesi colica in esperimenti a breve termine. Per caratterizzare ulteriormente queste lesioni abbiamo studiato tramite immunistochemica l'espressione della p27, una proteina inibitrice delle chinasi ciclino dipendenti, in grado di inibire la progressione del ciclo cellulare. I risultati hanno dimostrato che l'espressione nucleare della p27 (monoclonal mouse anti-human p27^{Kip1}) era marcatamente ridotta ($P < 0,001$) negli MDF rispetto alla mucosa normale. L'espressione citoplasmatica della proteina non era invece variata. In conclusione questo studio dimostra che gli MDF sono lesioni correlate con la cancerogenesi e che hanno una marcata riduzione della proteina p27 nel nucleo, un'alterazione presente in molti tumori e nei tumori del colon in particolare; questi risultati confermano quindi la natura precancerosa degli MDF.

CARATTERIZZAZIONE DELLE VARIANTI DI SPLICING DELLA DNA POLIMERASI BETA NEL CANCRO GASTRICO

Simonelli V.¹, D'Errico M.¹, Fortini P.¹, Sapeva C.², Palli D.², Dogliotti E.¹

¹Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Centro di Epidemiologia Molecolare e Nutrizionale, Firenze

La DNA polimerasi beta (Pol b) è la principale polimerasi coinvolta nel Base Excision Repair (BER). L'inattivazione o l'overespressione di Pol b può essere implicata in fenomeni di instabilità genomica e di cancerogenesi. La perdita di eterozigosi del cromosoma 8p, contenente il locus di Pol b, è un evento frequente in diversi tipi di cancro. Mutazioni inattivanti Pol b o alterazioni del suo livello di espressione sono state descritte in associazione con instabilità cromosomiche e potrebbero quindi fornire un vantaggio selettivo nella tumorigenesi. Abbiamo condotto un'analisi di Pol b in campioni biotici, di tessuto normale e tumorale, di pazienti affetti da tumore gastrico. Il cancro gastrico è, a livello mondiale, una patologia molto frequente, la cui eziologia è complessa e multifattoriale. Il campionamento è stato effettuato in un'area ad alta incidenza di cancro gastrico (Toscana, zona Nord-Est). Mentre l'analisi di sequenza del DNA non ha evidenziato la presenza di mutazioni, né nelle sequenze esoniche né nelle giunzioni di splicing, l'analisi del c-DNA di 20 pazienti e 3 linee cellulari ha portato all'identificazione di numerose varianti di Pol b, originatesi dalla perdita di uno o più esoni. La perdita degli esoni 2, 5, 6, 9 e alfa è risultata un evento molto frequente. In particolare, in alcuni individui, la variante priva dell'esone 2 è risultata più rappresentata rispetto alla forma normale. La variante priva dell'esone 2 origina una proteina di 26 amminoacidi, probabilmente priva di attività catalitica. Nell'ipotesi che queste varianti possano avere un ruolo nella regolazione dell'espressione di Pol b, molecole di c-DNA di Pol b sono state clonate all'interno di un vettore che permette l'espressione in cellule di mammifero. Fibroblasti murini proficienti e difettivi in Pol b sono stati trasfettati con il vettore contenente il c-DNA mancante dell'esone 2. Gli estratti dei cloni trasfettati sono stati testati in saggi di riparazione *in vitro*. I fibroblasti difettivi trasfettati con la proteina variante sono incapaci di catalizzare la reazione di riparazione *in vitro*. Inoltre, la sensibilità a un agente alchilante dei cloni trasfettati non viene alterata dall'espressione della proteina variante.

Prima Sessione Aula Marotta

**Effetti di lungo termine di danno ontogenetico
su indici neurocomportamentali:
modelli animali**

Moderatori

L.G. Costa, E. Alleva

MODELLI SPERIMENTALI PREDITTIVI DI VULNERABILITÀ NELL'UOMO: CRITICITÀ PER IL TERZO MILLENNIO

Alleva E., Branchi I.

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La tossicologia comportamentale è diventata una disciplina adulta nella prima metà degli anni settanta con la pubblicazione di *Behavioural Toxicology* di Bernard "Bernie" Weiss della scuola medica dell'Università di Rochester. Qui presso l'ISS già da alcuni anni Gian Luigi Gatti prima e Giorgio Bignami poi (in quel Laboratorio di Farmacologia originato da una Chimica terapeutica che data dai tempi di Daniel Bovet) davano un contributo pionieristico alla tossicologia comportamentale. Ma è stato soprattutto a partire dalla fondazione, del 1982, del Laboratorio FOS, e grazie alla sinergia con il gruppo coordinato da Hanna Michalek che la teratologia comportamentale è fiorita, e prosegue fino ai nostri giorni come testimoniato dall'intervento di Gemma Calamandrei. Il gruppo dell'ISS è stato latore di un messaggio particolare, quella analisi degli effetti di agenti farmacologici o tossicologici che producevano modificazioni comportamentali (reversibili o irreversibili) ma contemporaneamente tenevano conto del modello animale in una prospettiva ben diversa dall'antropocentrismo della tossicologia standard. Ratti e topi venivano considerati non come modelli della specie umana (che rimaneva il riferimento di sfondo), ma per le loro peculiarità specie-specifiche e soprattutto per le nicchie ecologiche che occupano nel breve tempo del loro sviluppo ontogenetico. Modificazioni comportamentali del periodo post-natale, della fase di permanenza nel nido, dell'adolescenza e dell'età giovane-adulta pre-riproduttiva sono stati sistematicamente studiati come fenomeni separati, adattando le metodologie etologiche e psicobiologiche alle varie fasi dello sviluppo ontogenetico con le loro sottili ripercussioni nell'adulto e nell'anziano. Il roditore immaturo non è stato considerato solo una versione semplificata del neonato o del bambino, ma ne è stata rispettata per esempio la peculiarità fisiologica di essere adattato a vita omeoterma e priva del senso della vista. I danni prodotti al sistema nervoso centrale sono stati quindi valutati secondo cronologie e biografie murine rispettose delle loro immaturità neurocomportamentali. Dopo un decennio e più trascorso a valutare gli effetti di esposizioni ontogenetiche a benzodiazepine, nei lustri successivi si è passati ad agenti gassosi (Ozono) e ad antiretrovirali (AZT, 3TC): in un'ottica di evoluzione metodologica che ha reso l'ISS un luogo di eccellenza per la teratologia comportamentale.

NEURODEGENERAZIONE DOPO IPOSSIA-ISCHEMIA DURANTE LO SVILUPPO CEREBRALE: DECORSO TEMPORALE E OPPORTUNITÀ TERAPEUTICHE

Balduini W.

Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino

L'ipossia-ischemia (HI) perinatale rappresenta un'importante causa di severi deficit neurologici a lungo termine tra cui sono inclusi ritardato sviluppo mentale e motorio, epilessia e deficit cognitivi. L'approccio clinico al feto e al neonato a rischio di ipossia-ischemia cerebrale è chiaramente una delle priorità della medicina pediatrica e una miglior comprensione della fisiopatologia del danno ipossico-ischemico perinatale è essenziale per lo sviluppo di efficaci interventi terapeutici. Gli studi su modelli animali di ischemia nell'adulto hanno messo in evidenza che in seguito a un insulto ischemico la morte cellulare avviene in due principali fasi: una prima rapida fase di morte necrotica e una seconda fase, ritardata, caratterizzata da infiammazione e morte cellulare di tipo apoptotico. Un'importante distinzione tra il danno ischemico perinatale in confronto a quello che avviene nell'adulto è che nel cervello immaturo la maggior parte delle aree ischemiche contiene cellule con caratteristiche morfologiche di tipo sia apoptotico che necrotico. Nel nostro laboratorio abbiamo di recente messo a punto un metodo che ci ha permesso di studiare il decorso temporale della morte apoptotica e necrotica dopo HI nel ratto neonato. Il metodo prevede la somministrazione intracerebroventricolare di propidio ioduro (PI) 20 minuti prima di sacrificare l'animale per la determinazione dell'espressione della forma attiva della caspasi-3 (p17) in microscopia a fluorescenza. Con questo metodo è possibile rilevare cellule necrotiche (positive al PI), cellule apoptotiche (positive alla caspasi-3) e cellule che mostrano caratteristiche ibride di apoptosi e necrosi (positive a caspasi-3 e PI). Trenta minuti e quattro ore dopo HI sono evidenziabili solo cellule positive al PI, in particolare nella regione CA1 dell'ippocampo. Il numero di queste cellule aumenta 12 ore dopo HI quando iniziano a essere presenti anche numerose cellule positive alla caspasi-3. Le cellule positive alla caspasi-3 aumentano con il tempo ma, tuttavia, un elevato numero di cellule positive al PI sono presenti anche dopo 4 giorni dall'HI. Inoltre, e in particolare nell'ippocampo, la maggior parte delle cellule risultano positive sia al PI che alla caspasi-3. Esperimenti di Western blot hanno confermato l'aumento dell'espressione di diverse proteine coinvolte nella morte apoptotica e necrotica. Questi dati indicano che la morte necrotica non è caratteristica della sola fase iniziale del danno ipossico ischemico ma può avvenire anche dopo diversi giorni dall'insulto e che possibili strategie terapeutiche dovrebbero essere mirate a bloccare entrambi i tipi di morte cellulare.

RISCHIO MULTIFATTORIALE DI DISORDINI NEUROCOMPORIMENTALI IN ETÀ EVOLUTIVA

Calamandrei G.

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Dati epidemiologici recenti riferiti ai paesi industrializzati suggeriscono che la prevalenza dei disordini comportamentali e psichiatrici in età evolutiva, che includono dislessie, deficit dell'attenzione e iperattività (ADHD), ritardo mentale lieve o moderato, l'autismo e quadri sindromici correlati sia significativamente aumentata nel corso dell'ultimo decennio. Numerose evidenze sperimentali sostengono un'origine multifattoriale di questi disordini, per cui fattori genetici, epigenetici o ambientali potrebbero indurre in fasi precoci dello sviluppo dell'organismo alterazioni "sottili" dello sviluppo cerebrale, soprattutto a carico di circuiti corticali. La convergenza di più fattori di rischio potrebbe favorire la comparsa di un disordine neurocomportamentale in fasi diverse dello sviluppo, dalla prima infanzia all'adolescenza. Tra i fattori di rischio ambientali vanno considerate le complicazioni ostetriche (nascita pretermine, anossia perinatale), l'esposizione in utero a farmaci e droghe d'abuso, nonché l'esposizione prolungata e a basse dosi a contaminanti ambientali potenzialmente assunti attraverso la placenta, l'allattamento e la dieta. Il background genetico può influenzare la vulnerabilità di un individuo nei confronti di fattori di rischio ambientali. Un esempio è quello relativo ad alcuni polimorfismi del gene della paraoxonasi, enzima coinvolto nella detossificazione da pesticidi organofosforici, che aumenterebbero la vulnerabilità agli effetti di questi stessi agenti, o di varianti alleliche del gene del trasportatore presinaptico della dopamina, (possibilmente associate a ADHD) che determinerebbero una maggiore suscettibilità alle esposizioni a neurotossici nella vita fetale. L'eziologia multifattoriale di molti disordini del neurosviluppo richiede modelli sperimentali adeguati. Gli studi di teratologia comportamentale condotti in modelli animali hanno significativamente aumentato la conoscenza dei meccanismi attraverso i quali molti xenobiotici influenzano lo sviluppo del cervello e del comportamento. Gli studi su modelli animali consentono l'analisi di parametri di difficile valutazione nelle popolazioni a rischio, come il ruolo delle variabili multiple, i periodi critici di suscettibilità, la possibilità di effetti additivi o sinergici di diversi fattori di rischio, e la valutazione degli effetti a lungo termine. Gli effetti neurocomportamentali a breve, medio e lungo termine dell'esposizione fetale a farmaci antiretrovirali, al pesticida organofosforico clorpirifos, o quelli osservabili in ratti con anossia perinatale interessano in misura maggiore funzioni non cognitive, quali i comportamenti sociali, le risposte emozionali, e in generale la reattività a stimoli ambientali. Questi modelli di "danno" lieve/moderato possono rappresentare un valido strumento di analisi dei fattori di rischio, e della loro combinazione, di disordini neurocomportamentali e psichiatrici nella specie umana.

XENOESTROGENI: EFFETTI NEUROCOMPORIMENTALI A LUNGO TERMINE NEL RATTO

Dessi-Fulgheri F.¹, Della Seta D.², Belloni V.¹, Farabollini F.²

¹*Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Università degli Studi di Firenze;*

²*Dipartimento di Fisiologia, Università degli Studi di Siena*

Una vasta gamma di sostanze ad azione endocrina prodotte dall'uomo è in grado di modificare in comportamento dei vertebrati superiori. In particolare le sostanze ad azione estrogenica possono interferire con i meccanismi di differenziamento sessuale precoce a livello del SNC: esiste infatti una finestra temporale perinatale durante la quale gli ormoni endogeni, e in particolare l'estradiolo, determinano dei processi irreversibili, responsabili non solo delle differenze sessuali, ma anche di parte della variabilità individuale. In questa relazione riferiamo di una serie di lavori che abbiamo condotto per verificare gli effetti di un'esposizione perinatale e postatale a due xenoestrogeni diffusi nell'ambiente e che presentano una potenziale specifica minaccia per la salute dell'uomo: bisfenolo-A ed etinilestradiolo. Il primo è il costituente base di una serie di prodotti che vanno dalla conservazione degli alimenti all'uso dentistico, il secondo è l'estrogeno presente nella pillola anticoncezionale e si ritrova nelle acque reflue. Abbiamo osservato gli effetti di queste sostanze, somministrate in età perinatale a basse dosi, compatibile con quelle rilevabili nell'ambiente. Poiché sono descritti degli effetti sul comportamento degli steroidi sessuali, se somministrati prima della maturità sessuale, abbiamo anche trattato con queste due sostanze ratti di entrambi i sessi in età prepubere. Abbiamo preso in considerazione, nell'adulto trattato perinatalmente e prepuberalmente, il comportamento sociale, non sociale e sessuale. In complesso l'espressione di comportamenti appartenenti a ciascuna di queste categorie comportamentali viene influenzata in modo significativo dalla somministrazione precoce di basse dosi di questi xenoestrogeni, che agiscono come interferenti endocrini potenzialmente pericolosi per la salute e per l'ambiente.

GLUCOCORTICOIDI PERINATALI E “PROGRAMMAZIONE” A LUNGO TERMINE

Catalani A., Casolini P., Maccari S.

Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Università degli Studi La Sapienza, Roma

Geni e ambiente contribuiscono in una dinamica interdipendenza allo sviluppo dell'individuo. L'ambiente attraverso la modulazione dei livelli di glucocorticoidi, fattori determinanti nella “programmazione” dell'organismo, esercitano azioni necessarie e benefiche, che possono diventare però deleterie a seconda dello stadio dello sviluppo e della loro concentrazione. Il feto si protegge infatti da un eccesso di glucocorticoidi materni con un enzima placentare che li catabolizza e il neonato presenta un periodo di iporesponsività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene che non permette una eccessiva increzione di questi ormoni. Lo stress prenatale nel ratto operato con una breve quotidiana immobilizzazione materna aumenta i livelli di corticosterone nella madre, e induce nella prole in età adulta una diminuzione dei recettori del glutammato mGlu5, appartenenti al gruppo I dei recettori metabotropici, gruppo coinvolto nella neurogenesi. Ratti sottoposti a stress prenatale mostrano in età adulta una diminuzione della neurogenesi e una diminuita capacità di apprendimento. Un altro approccio allo studio dei glucocorticoidi in età perinatale ha dimostrato che se il corticosterone è aggiunto nell'acqua da bere delle ratte madri durante l'allattamento, la prole adulta presenta una diminuzione dei recettori metabotropici del glutammato del sottotipo mGlu1, coinvolti nel danno neurotossico. Gli stessi animali presentano, da adulti, un aumento dei recettori corticosteroidi ippocampali e una diminuzione della risposta ormonale allo stress. Questo particolare profilo neuroendocrino contribuisce alla protezione, osservata negli animali esposti a ipercorticosteronemia neonatale, dai danni indotti da un insulto ischemico cerebrale in età adulta. Le loro capacità di apprendimento in un labirinto acquatico sono infatti migliori dopo ischemia e i neuroni della regione CA1 dell'ippocampo, area particolarmente vulnerabile a un insulto ischemico, sono parzialmente protetti, rispetto ad animali sottoposti allo stesso modello di ischemia, ma non esposti a corticosterone in età neonatale. Effetti deleteri quindi se l'esposizione ai glucocorticoidi avviene in età prenatale e benefici se accade durante la vita neonatale; negativi se gli aumenti dell'ormone avvengono con tre episodi acuti quotidiani nella fase di luce in gravidanza e positivi se gli aumenti sono moderati e distribuiti nell'arco delle 24 ore durante l'allattamento. Le due manipolazioni influenzano in maniera opposta anche il comportamento materno con una minor cura per i piccoli dopo stress prenatale e maggiore invece durante l'ipercorticosteronemia postnatale. Questi studi hanno permesso di indagare gli effetti dei glucocorticoidi in maniera del tutto fisiologica senza una somministrazione di corticosterone esogeno.

Seconda Sessione Aula Pocchiari
Valutazione del rischio nell'esposizione professionale
e ambientale a benzene:
studio dei meccanismi di attivazione
e tossicità e degli indicatori di esposizione,
effetto e suscettibilità

Moderatori
V. Foà, P. Hrelia, M. Manno

EFFETTO DEL TRATTAMENTO SUBCRONICO CON BENZENE IN TOPI C57BL

Dragoni S.¹, Materozzi G.¹, Curci G., Franceschetti P.², Doria D.², Fracasso M.E.², Valoti M.¹
¹*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Siena;* ²*Dipartimento di
Medicina e Salute Pubblica, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Verona*

Il benzene è un composto in grado di determinare la comparsa di anemia aplastica e leucemia mieloide acuta nell'uomo e forme diverse di cancro nei roditori. Il benzene è metabolizzato nel fegato, a opera del citocromo P450 2E1, in fenolo, catecolo e idrochinone. I derivati fenolici, successivamente, a opera della mieloperossidasi presente nel midollo osseo, possono originare radicali semichinonici responsabili della tossicità del benzene. Lo scopo di questo lavoro è stato studiare l'effetto del trattamento con benzene a basse e alte dosi (5 e 100 mg/kg) in topi C57BL. Topi C57BL maschi sono stati suddivisi in 4 gruppi ciascuno dei quali era trattato per 15 giorni p. os. con: soluzione fisiologica, veicolo (olio), benzene a 5 e 100 mg/kg p.c., rispettivamente. Alla fine del trattamento erano prelevati da ciascun animale fegato e midollo osseo su cui veniva determinata l'attività di enzimi di fase I e II, la densità cellulare, la conta delle cellule apoptotiche, il danno al DNA. La conta delle cellule del midollo osseo, effettuata in sezioni di sterno, ha evidenziato già a basse dosi di benzene una significativa diminuzione della densità cellulare (40%) dovuta probabilmente a un aumento delle cellule apoptotiche come osservato nell'analisi TUNEL. Inoltre, il comet assay ha evidenziato un danno genotossico significativo già alle basse dosi di benzene somministrato. Il dosaggio delle attività enzimatiche a livello epatico ha permesso di evidenziare un incremento in alcune attività marker per il citocromo P450, non correlate tuttavia al metabolismo del benzene. Inoltre è stato osservato un aumento di enzimi di fase II quali: sulfotransferasi, glutatione-S-transferasi e NADP(H)-chinone ossido redattasi (NQO1). Nel midollo osseo, l'attività della MPO veniva incrementata in seguito a trattamento, mentre nessuna variazione significativa si osservava nell'attività della NQO1. Questi studi suggeriscono che l'aumento della MPO, non accompagnato da un aumento parallelo di NQO1, possa giocare un ruolo chiave nel danno tossico promosso dai metaboliti del benzene nel midollo osseo e, viceversa l'aumento delle attività degli enzimi di fase II a livello epatico potrebbero spiegare la non tossicità del benzene a carico di questo organo.

Questo lavoro è stato svolto con il supporto del MIUR, PRIN 2003, #2003063319_002

MONITORAGGIO AMBIENTALE E BIOLOGICO DELL'ESPOSIZIONE A BENZENE

Bartolucci G.B.¹, Carrieri M.¹, Piccoli P.¹, Gori G.¹, Maccà I.¹, Scapellato M.L.¹, Franceschetti P.², Fracasso M.E.², Soleo L.³, Manno M.⁴

¹Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Padova;

²Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Verona;

³Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università degli Studi di Bari;

⁴Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, Università degli Studi di Napoli Federico II

Introduzione. Negli ultimi anni si è manifestato un nuovo interesse, sia da parte dei ricercatori che dell'opinione pubblica, per il benzene in seguito alla diffusione di questa sostanza in ambiente di vita, in relazione soprattutto all'inquinamento da traffico veicolare. Il benzene viene pertanto considerato un potenziale rischio non solamente per alcune categorie di soggetti professionalmente esposti, ma anche per la popolazione generale. Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare gli attuali livelli di esposizione e individuare un protocollo per il monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione a tale solvente.

Materiali e Metodi. L'esposizione individuale a benzene è stata misurata con il campionatore diffusivo Radiello applicato all'altezza delle vie respiratorie dei soggetti in studio per la durata dell'attività lavorativa; la successiva analisi è stata condotta per via gascromatografica-FID previo desorbimento con CS₂. Al termine del monitoraggio ambientale è stato raccolto un campione di urine sul quale sono stati dosati i metaboliti del benzene acido *t,t*-muconico (*t,t*-MA) e acido S-fenilmercapturico (S-PMA); il dosaggio del *t,t*-MA è stato effettuato in HPLC-diode-array a 260 nm; quello dell'S-PMA con metodo immunochimico. I livelli urinari dei metaboliti sono stati espressi in funzione della creatinuria (scartando i soggetti con valori fuori dal range 0,5-3.0 g/l).

Risultati. Sono stati esaminati un totale di 45 soggetti non esposti professionalmente (23 fumatori e 22 non fumatori) e 248 appartenenti a differenti tipologie lavorative: in particolare 174 lavoratori dell'industria petrolchimica (74 fumatori e 100 non fumatori), 55 addetti alla distribuzione di carburanti (19 fumatori e 36 non fumatori) e 19 addetti alla manutenzione delle pompe di benzina (8 fumatori e 11 non fumatori). L'esposizione a benzene è risultata superiore, in maniera statisticamente significativa ($p < 0,001$), nei soggetti professionalmente esposti rispetto ai controlli (rispettivamente media 44,7 e range <3-593,5 µg/m³ contro 6,6 e <3-16,3 µg/m³); tale significatività non è stata confermata tra i valori dei due indicatori biologici (*t,t*-MA rispettivamente media 112,4 e range 8,9-477 µg/g creatinina contro 100,0 e 8-445,0 µg/g creatinina; S-PMA rispettivamente media 3,9 e range <0,5-35,6 µg/g creatinina contro 3,9 e <0,5-15,4 µg/g creatinina); l'escrezione dei due metaboliti è risultata, sia negli esposti che nei controlli, superiore nei fumatori rispetto ai non fumatori. All'interno dei soggetti professionalmente esposti i livelli di benzene ambientale maggiori sono stati riscontrati negli addetti alla distribuzione di carburanti (mediana 36,0 e range: 8-260 µg/m³), seguiti dagli addetti alla manutenzione delle pompe di benzina (mediana 22 e range: 4,6-514,9 µg/m³) e dai lavoratori dell'industria petrolchimica (mediana 14,0 e range: <3-593,5 µg/m³). Nessuna correlazione è stata evidenziata tra

esposizione individuale ed escrezione dei metaboliti urinari nei controlli. Negli esposti è stata evidenziata una correlazione bassa ($r=0,31$) ma statisticamente significativa ($p<0,001$) tra esposizione individuale e *t,t*-MA, correlazione che migliora lievemente nei non fumatori ($r=0,39$); l'escrezione dell'*S*-PMA è risultata statisticamente correlata con quella del *t,t*-MA ($r=0,37$; $p<0,001$) ma non con l'esposizione ambientale.

Conclusioni. I livelli di esposizione a benzene per le diverse categorie lavorative sono risultati decisamente contenuti, anche se superiori rispetto ai soggetti di controllo. A questi bassi livelli di benzene il monitoraggio ambientale sembra essere il metodo migliore per valutare l'esposizione individuale, in quanto l'influenza del fumo e la variabilità rendono di difficile applicazione l'uso degli indicatori biologici come espressione dell'esposizione individuale.

Questa ricerca è stata finanziata dal progetto MIUR-PRIN 2003, N. 2003063319_003

ESPOSIZIONE A BASSE DOSI DI BENZENE: CORRELAZIONI FRA MARKER D'ESPOSIZIONE E MARKER D'EFFETTO GENOTOSSICO

Fracasso M.E.¹, Franceschetti P.¹, Doria D.¹, Bartolucci G.B.², Carrieri M.², Lovreglio P.³, Ballini A.³, Manno M.⁴, Soleo L.³

¹Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Verona; ²Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Padova; ³Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università degli Studi di Bari; ⁴Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, Università degli Studi di Napoli FedericoII

Introduzione. In seguito alla progressiva riduzione dei livelli di benzene in molti ambienti lavorativi, l'attenzione si è focalizzata sulla possibile insorgenza di malattie legate anche a basse dosi di esposizione. La tossicità del benzene è in gran parte dovuta alla formazione di metaboliti intermedi altamente reattivi quali *t,t*-muconaldeide e il benzene ossido. Quest'ultimo reagisce con i gruppi tiolici presenti nel glutatione, portando alla formazione di acido S-fenilmercapturico, che viene escreto con le urine. I prodotti metabolici reattivi sono un evento cruciale nell'indurre genotossicità per la loro tendenza a reagire con acidi nucleici e altre macromolecole cellulari. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti indotti da esposizione a basse dosi di benzene in tre gruppi di lavoratori: occupati presso un'industria petrolchimica, benzinai e manutentori di pompe di carburante.

Materiali e Metodi. I campionamenti personali sono stati utilizzati per valutare l'esposizione ambientale, i campioni di urina per il dosaggio dell'ac. *t,t*-muconico (*t,t*-MA) e dell'ac. S-fenilmercapturico (S-PMA). In linfociti di sangue periferico venivano valutati i parametri di danno al DNA, mediante la versione alcalina del comet assay (TM: tail moment; TL: tail length; % DNA nella coda; numero di cellule con cometa) e la determinazione dei livelli di GSH cellulare.

Risultati. I risultati ottenuti indicano che i livelli espositivi a benzene sono significativamente più alti nei lavoratori rispetto ai controlli. L'eliminazione urinaria di *t,t*-MA è simile nei soggetti esposti e non esposti, mentre S-PMA mostra un aumento significativo solo nel gruppo dei lavoratori impiegati nel settore petrolchimico e nei benzinai. Il danno al DNA (TM) nei linfociti risulta significativamente superiore (Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$) nel gruppo dei soggetti occupati nell'industria petrolchimica ($p < 0,0001$) e nei benzinai ($p < 0,004$) rispetto ai controlli. Il livello di GSH nei linfociti dei benzinai e dei manutentori è più alto del 15% e dell'11% rispettivamente, confrontato con quello dei controlli. Correlazioni positive e significative sono state riscontrate tra i livelli espositivi e i parametri del comet in tutti e tre i gruppi di soggetti esposti (petrolchimica: TM, $r = 0,711$, $p < 0,027$; benzinai: TM, $r = 0,509$, $p < 0,007$; manutentori: TM, $r = 0,525$, $p < 0,017$) e correlazioni negative tra danno al DNA e GSH. Una correlazione negativa è presente anche tra danno al DNA e S-PMA nei benzinai e nei lavoratori nell'industria petrolchimica. Nessuna correlazione con gli stessi parametri è stata riscontrata nel gruppo

di controllo. Inoltre il fumo di sigaretta da solo non sembra essere un fattore che porti a un aumento significativo il danno al DNA.

Conclusioni. Questi risultati indicano che i livelli urinari di S-PMA e la valutazione del danno al DNA in linfociti mediante comet assay sono marker particolarmente sensibili nel riconoscere effetti espositivi del benzene a basse dosi.

Questo lavoro è stato supportato dal finanziamento MIUR-PRIN 2003, N 2003063319_005

ABERRAZIONI CROMOSOMICHE (CA) E INDICE PROLIFERATIVO (PI) IN UN GRUPPO DI ADDETTI AL RIFORNIMENTO DI CARBURANTE ESPOSTI A BASSE DOSI DI BENZENE

Soleo L.¹, Lovreglio P.¹, Ballini A.¹, Bartolucci G.B.², Carrieri M.², Franceschetti P.³, Doria D.³, Manno M.⁴, Fracasso M.E.³

¹Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università degli Studi di Bari;

²Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Padova;

³Dipartimento di Medicina Generale e Salute Pubblica, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Verona; ⁴Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, Università degli Studi di Napoli Federico II

Introduzione. L'esposizione professionale a benzene è attualmente limitata ad alcune attività lavorative ove le concentrazioni ambientali, in seguito agli interventi di prevenzione primaria effettuati, tendono sempre più ad avvicinarsi a quelle presenti negli ambienti di vita. In questi ultimi, infatti, il benzene è un inquinante pressoché ubiquitario, in quanto presente nel fumo di sigaretta, nei carburanti e nelle emissioni degli autoveicoli. L'obiettivo della presente ricerca è quello di verificare se l'esposizione professionale a concentrazioni di benzene molto basse sia in grado di determinare effetti genotossici, indagati attraverso lo studio della frequenza di aberrazioni cromosomiche (CA) e dell'indice proliferativo (PI).

Materiali e Metodi. Sono stati esaminati 19 lavoratori addetti al rifornimento di carburante presso stazioni di servizio (esposti) e 16 lavoratori non professionalmente esposti a benzene (non esposti). Per tutti i soggetti l'esposizione a benzene è stata misurata mediante campionamento personale durato per l'intero turno di lavoro. Alla fine del turno è stato raccolto un campione estemporaneo di urine per la determinazione dell'acido *t,t*-muconico e dell'acido S-fenilmercapturico, mentre all'inizio del turno sono stati prelevati 5 ml di sangue venoso periferico per la determinazione di CA e PI. I campioni ematici sono stati trasportati a temperatura ambiente e processati entro 24 ore dal prelievo; le successive analisi sono state effettuate secondo procedure standard.

Risultati. Esposti e non esposti non hanno mostrato differenze per quanto riguarda l'età, mentre il body mass index (BMI) è risultato significativamente più elevato negli esposti rispetto ai non esposti ($p=0,01$). L'esposizione a benzene è risultata più elevata nel gruppo degli esposti (media $58,3\pm 62,8$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$; mediana $35,1$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$; range $8-260$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$) rispetto ai non esposti (media $5,0\pm 0,9$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$; mediana $4,7$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$; range $4,2-7,5$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$), con una differenza che ha raggiunto la significatività statistica ($p<0,001$). I lavoratori esposti e non esposti, invece, non hanno mostrato differenze significative sia per i livelli urinari di acido *t,t*-muconico e S-fenilmercapturico, sia per la frequenza di CA e il PI, sebbene l'acido S-fenilmercapturico medio fosse più alto negli esposti con una differenza ai limiti della significatività ($p=0,06$). Suddividendo tutti i soggetti in fumatori e non fumatori, nessuna differenza significativa è stata evidenziata tra i due gruppi per l'esposizione a benzene, per gli indicatori biologici, per la frequenza di CA e per il PI. Nessuna correlazione significativa è stata osservata infine tra la frequenza di CA o il PI e i livelli rispettivamente

di benzene aerodisperso, di acido *t,t*-muconico e S-fenilmercapturico, mentre un'associazione positiva è risultata tra frequenza di CA e numero di sigarette fumate/die ($r=0,387$; $p=0,02$). Una correlazione negativa, peraltro senza significatività statistica, è stata osservata tra i due indicatori utilizzati, frequenza di CA e PI ($r=-0,289$; $p=0,09$).

Conclusioni. La frequenza di CA e il PI non sembrano essere influenzati dall'esposizione alle dosi di benzene molto basse rilevate nello studio, mentre si evidenzia una possibile relazione tra fumo di sigaretta e frequenza di CA.

Questa ricerca è stata finanziata dal progetto MIUR-PRIN 2003, N 2003063319_005

BIOMARCATORI GENETICI E DI SUSCETTIBILITÀ PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA BENZENE AMBIENTALE IN AGENTI DI POLIZIA

Maffei F.¹, Angelini S.¹, Carbone F.¹, Cantelli Forti G.¹, Kumar R.², Hemminki K.², Violante F. S.³, Hrelia P.¹

¹*Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna;* ²*Division of Molecular Genetic Epidemiology, German Cancer Research Center, Heidelberg;* ³*Unità di Medicina del Lavoro, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna*

L'inquinamento delle aree urbane costituisce un importante problema di sanità pubblica in quanto, non solo interessa tutte le fasce di popolazione che abitano nelle grandi città, ma rappresenta un ambiente di lavoro per alcune categorie professionali tra cui agenti di polizia e addetti ai trasporti. Tra gli inquinanti urbani, il benzene è considerato prioritario per i suoi effetti tossici a carico del sistema emopoietico, che si manifestano con, pancitopenia, anemia aplastica e nelle situazioni più gravi leucemia. È stato iniziato uno studio di epidemiologia molecolare per la valutazione della relazione tra esposizione ambientale e personale al benzene e la risposta di biomarcatori di effetto e di suscettibilità in un gruppo di cittadini dell'area urbana di Bologna. Attualmente lo studio è stato condotto su un gruppo di 50 agenti di polizia municipale (età: 39±7; Femmine/maschi: 21/29; Non-fumatori/fumatori: 32/18) che svolgono la loro attività di servizio in zone ad alto traffico di Bologna e in un gruppo di controllo costituito da 50 individui sani residenti nell'area urbana di Bologna, che svolgono la loro professione in ambienti confinati (età: 40±7; Femmine/maschi: 20/30; Non-fumatori/fumatori: 31/19). Il disegno sperimentale ha previsto la determinazione dei livelli di esposizione personale a benzene mediante campionatore a simmetria radiale (Radiello), e l'analisi di biomarcatori di effetto, quali i micronuclei (MN) nei linfociti di sangue periferico dei soggetti di entrambi i gruppi in studio. L'analisi dei MN permette di evidenziare contemporaneamente effetti clastogeni e aneuploidogeni e quindi costituisce un utile approccio per la stima del rischio associato all'inquinamento urbano. Inoltre, come biomarcatori di suscettibilità sono stati analizzati i polimorfismi in geni che codificano per alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo del benzene (MPO, Famiglia della GST) applicando la metodica della PCR combinata con analisi mediante enzima di restrizione (RFLP). I risultati ottenuti hanno indicato un aumento significativo delle frequenze di MN negli agenti di polizia municipale rispetto al gruppo di controllo (7,60±2,60 vs 4,40±1,60 P=0,01). I preliminari dati relativi all'analisi dei genotipi ha evidenziato, nel gruppo degli agenti di polizia municipale frequenze di MN più elevate nei soggetti con genotipo GSTT1 nullo rispetto ai soggetti GSTT1 positivi (8,30±4,64 vs 6,80±2,10), mentre per gli altri geni al momento analizzati (GSTP1, MPO) non sono stati osservati effetti rilevanti. L'insieme delle informazioni suggeriscono che l'esposizione professionale al benzene in ambiente urbano può rappresentare un rischio genetico, e queste conoscenze possono contribuire alla definizione di efficaci misure preventive.

METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DI BENZENE URINARIO, ACIDO FENILMERCAPTURICO E ADDOTTI EMOGLOBINICI QUALI BIOMARCATORI DELL'ESPOSIZIONE A BENZENE: OTTIMIZZAZIONE, CONFRONTO E APPLICAZIONI

Basilicata P.¹, Miraglia N.^{1,2}, Genovese G.², Guadagni R.², Simonelli A.¹, Pieri M.^{1,2}, Castiglia L.², Acampora A.², Sannolo N.¹

¹*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale, Seconda Università degli Studi di Napoli;* ²*Dipartimento di Medicina Pubblica e della Sicurezza Sociale, Università degli Studi di Napoli Federico II*

A causa dell'elevata cancerogenicità del benzene, i valori limite di soglia occupazionali (TLV) sono stati progressivamente ridotti, determinando, laddove possibile, una diminuzione del suo uso in ambito industriale, con conseguente riduzione dei livelli di esposizione. Il monitoraggio biologico dei lavoratori professionalmente esposti a basse dosi di benzene e della popolazione generale (il benzene è un inquinante ubiquitario) necessita, quindi, di adeguati biomarcatori che possano essere rilevati mediante metodiche quanto più sensibili, specifiche e riproducibili. Lo studio è stato focalizzato sul possibile utilizzo di tre diversi biomarcatori -benzene urinario, acido fenilmercapturico (S-PMA), addotti covalenti fra metaboliti del benzene ed emoglobina- per ciascuno dei quali è stato sviluppato e ottimizzato un metodo analitico. Il benzene viene estratto dalle urine mediante spazio di testa e microestrazione in fase solida, con successiva analisi GCMS e quantificazione con il metodo delle aggiunte; tale metodo permette di quantificare l'analita anche se presente in basse concentrazioni, prescindendo dall'influenza dovuta alla complessità della matrice urinaria e superando le problematiche connesse con l'elevata variabilità interindividuale dei livelli basali di benzene. La quantificazione dell'S-PMA urinario prevede: purificazione in HPLC, analisi LC/ESI-NI/MS², sintesi dell'acido *p*-bromo-S-fenilmercapturico da adoperare quale standard interno. Entrambe le procedure sono state utilizzate nella valutazione dell'esposizione a benzene di lavoratori impiegati in un deposito di stoccaggio carburante. Fra i metaboliti reattivi del benzene in grado di interagire con i gruppi nucleofili delle macromolecole sono stati considerati la muconaldeide (MA) e l'ossido di benzene (BO). Lo studio degli addotti prevede l'incubazione degli agenti elettrofilici, inizialmente, con peptidi modello che simulino e semplifichino il materiale proteico e, successivamente, con l'emoglobina. Le miscele di incubazione vengono poi analizzate mediante LC/ESI/MS. La MA, agente bifunzionale, forma facilmente legami crociati intra- e intermolecolari, vanificando l'effettiva possibilità di usare peptidi emoglobinici alchilati da MA quali biomarcatori per il monitoraggio biologico dell'esposizione a benzene, in quanto l'analisi risulta particolarmente laboriosa e il biomarcatore poco sensibile. L'ossido di benzene, altamente instabile, non è commercializzato, pertanto risulta indispensabile progettare e ottimizzare la sintesi della molecola, fino all'ottenimento di un prodotto puro. Tale prodotto è stato, quindi, utilizzato per indagare l'interazione del metabolita con le proteine, anche in questo caso, mediante studi preliminari condotti con peptidi. I primi risultati evidenziano la formazione di un unico addotto covalente e pongono le basi per ulteriori indagini tese alla caratterizzazione di addotti emoglobinici che possano fungere da indicatori di esposizione ottimali.

FENOTIPIZZAZIONE *IN VIVO* DEL CYP 2E1: UNA NUOVA METODICA PER IL MONITORAGGIO BIOLOGICO NELL'ESPOSIZIONE OCCUPAZIONALE E SPERIMENTALE A BENZENE

Piccoli P.^{1,2}, Carrieri M.², Salamon F.², Bartolucci G.B.², Manno M.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, Sezione di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Napoli Federico II; ²Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Padova

Introduzione. Il CYP 2E1 è coinvolto nell'ossidazione dell'etanolo, di vari solventi organici e di numerose sostanze ad attività cancerogena, quali benzene, nitrosamine, e altre. Essendo la sua attività enzimatica modulata in ciascun individuo sia dal genotipo che da fattori ambientali, la determinazione del fenotipo CYP 2E1 costituisce un elemento importante per la valutazione della suscettibilità individuale agli eventuali effetti tossici delle sostanze metabolizzate da questa isoforma. Per valutare l'attività enzimatica del CYP 2E1 *in vivo* sono stati proposti vari substrati specifici, ma solo il clorzoazone, un miorilassante sistemico ad azione centrale, risulta sicuro e affidabile per il suo utilizzo nell'uomo. Il fenotipo viene espresso numericamente come rapporto tra il metabolita 6-idrossiclorzoazone (6-OH CHZ) e il clorzoazone (CHZ).

Scopo. Questo lavoro presenta un duplice scopo: da un lato si è voluto mettere a punto una metodica semplice, accurata e sensibile per la determinazione plasmatica del clorzoazone e del suo metabolita 6-idrossiclorzoazone nell'uomo; dall'altro si è voluto utilizzare questa metodica per lo studio degli effetti del benzene sul fenotipo CYP 2E1 in un modello animale.

Materiali e Metodi. Per il dosaggio di CHZ e 6-OH CHZ, i due analiti e la fenacetina, utilizzata come standard interno, sono stati estratti mediante il *ter*-butil metil etere e concentrati in centrifuga aspirata UNIVAPO 100 H. Il campione così trattato e ricostituito in 200 µl di fase mobile è stato analizzato in HPLC/DAD su una colonna C18 ODS 5 µm con una fase mobile costituita da acetonitrile e acido acetico 0,5% (30:70 v/v rispettivamente), alla lunghezza d'onda di 287 nm. A due gruppi di topi maschi (CD-1, 25-35g), di 5 animali ciascuno, è stato iniettato, per via intraperitoneale, 1 ml/Kg b.w. di olio di semi (veicolo) al primo gruppo (controllo), e benzene pari a 5 mmol/Kg b.w. in 1 ml/Kg di olio di semi al secondo gruppo (trattati). Tale trattamento si è protratto per 3 giorni consecutivi; 24 ore dopo l'ultima somministrazione di veicolo o benzene rispettivamente, è stato somministrato a ciascun animale il clorzoazone (40 mg/Kg b.w.) per via intra peritoneale. Dopo 30 minuti i topi sono stati sacrificati e dal sangue ottenuto si sono ricavati 300 µl di plasma sui quali si sono dosati 6-OH CHZ e CHZ.

Risultati e Discussione. Il metodo da noi messo a punto presenta un limite di rilevabilità pari a 0,025 µg/ml per entrambi gli analiti. Le rette di calibrazione nell'intervallo di concentrazione 0,025-5 µg/ml mostrano un coefficiente di correlazione di 0,9994 e di 0,9996 rispettivamente per il 6-OH-CHZ e per il CHZ. I due analiti eluiscono in 14 minuti e questo fa sì che l'analisi non duri più di 16 minuti. I coefficienti di variazione interday e

intraday sono rispettivamente <12% e <9%. I rapporti metabolici 6-OH CHZ/CHZ riscontrati nei due gruppi di animali trattati sono risultati pari a $0,069 \pm 0,044$ nel gruppo di controllo e $0,030 \pm 0,022$ nel gruppo trattato con benzene. La differenza tra i due gruppi non è risultata statisticamente significativa a causa della grande variabilità. Su tali dati è stato eseguito il test della potenza che ha suggerito l'utilizzo di almeno 10 animali per gruppo per avere una potenza pari a 0,8. Gli esperimenti finora condotti indicano una possibile inibizione competitiva del benzene sull'attività CYP 2E1 nel topo e suggeriscono ulteriori studi per valutare se il topo può essere un buon modello nello studio del fenotipo metabolico CYP 2E1.

Questo lavoro è stato supportato dal finanziamento MIUR-PRIN 2003, N. 2003063319_001

Seconda Sessione Aula Bovet
Nuove acquisizioni
sui meccanismi neurobiologici
e neurotossicologici delle sostanze d'abuso

Moderatori
V. Cuomo, P. Nencini

MECCANISMI NEUROBIOLOGICI DELLA DIPENDENZA DA NICOTINA

Frattoni W.

Dipartimento di Neuroscienze e Centro di Eccellenza sulla Neurobiologia delle Dipendenze, Università degli Studi di Cagliari

La Nicotina è il principale componente psicoattivo del tabacco ed è responsabile degli effetti gratificanti che portano a una forte dipendenza e a un'altissima incidenza di ricidiva al fumo di tabacco. Benchè i meccanismi molecolari responsabili, a livello del Sistema Nervoso Centrale, della dipendenza da Nicotina non siano ancora completamente identificati e chiariti è però certo che l'assunzione di Nicotina modifica la funzione di diversi neurotrasmettitori. In particolare, così come per altre sostanze d'abuso quali l'eroina, l'alcol, la cocaina, la cannabis, la Nicotina stimola la liberazione di Dopamina nel Sistema Mesolimbico. L'attivazione di questo sistema dopaminergico è alla base degli effetti gratificanti della Nicotina. Un gran numero di evidenze sperimentali sia di tipo neurochimico che elettrofisiologico e comportamentale nell'animale indica che gli effetti gratificanti della Nicotina sono dovuti all'interazione di questa molecola con recettori nicotinici neuronali. In particolare sembrano essere coinvolti il recettore omomeroico alfa 7 e il recettore eteromeroico beta 2. Questi recettori sono particolarmente presenti nell'area ventrotegmentale, dalla quale originano i neuroni dopaminergici mesolimbici, e sono situati sia sul corpo cellulare dei neuroni dopaminergici, sia su afferenze eccitatorie glutammatergiche che su afferenze inibitorie gabaergiche. Dalle complesse interazioni tra questi sistemi neurotrasmettitoriali e dalla differente sensibilità e capacità di desensitizzazione di questi recettori, risulterebbe l'effetto di stimolazione della liberazione di dopamina dalle terminazioni dopaminergiche del nucleus accumbens.

RUOLO DEI METABOLITI NELLA DIPENDENZA DA HEROINA

Antonilli L., Badiani A., Nencini P.

Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma

L'eroina (3,4 diacetilmorfina) è rapidamente metabolizzata, nell'organismo a 6-monoacetilmorfina (6-MAM) e quindi a morfina. Questa è a sua volta trasformata, a opera della UDP-glucosiltransferasi (UGT), in morfina-3-glucuronide (M3G, 55%), privo di attività oppioide e in morfina -6- glucuronide (M6G, 15%), potente agonista dei recettori oppiacei μ (MOPR). Pertanto modificazioni del tasso di formazione di M6G possono avere rilevanti conseguenze farmacologiche in soggetti cronicamente esposti all'eroina. Nostri precedenti studi indicano che soggetti eroinomani presentano, a livello plasmatico e urinario, un rapporto M3G/M6G significativamente più basso rispetto a soggetti esposti a morfina. Esperimenti successivi, condotti sul modello animale e volti a definire gli aspetti cinetici della glucuronazione della morfina, hanno evidenziato che microsomi di ratti trattati cronicamente con eroina, sintetizzano quantità misurabili di M6G, metabolita normalmente non prodotto da questa specie, e manifestano una ridotta capacità di formazione di M3G. Il trattamento acuto con eroina e l'esposizione a morfina (cronicamente e acutamente) non inducono la sintesi di M6G. Per testare l'ipotesi che tali effetti siano mediati da una attivazione dei MOPR sono stati introdotti, nello studio, il naltrexone e il metadone, rispettivamente antagonisti e agonisti dei MOPR. I risultati ottenuti indicano che entrambe le molecole, pur inducendo la formazione della M3G, non hanno effetti sulla sintesi della M6G. Ciò suggerisce che l'eroina ha un effetto del tutto peculiare sul metabolismo della morfina attivando preferenzialmente la sintesi del metabolita attivo M6G. Tale ipotesi può valere anche per il modificato rapporto M3G/M6G osservato nei soggetti dipendenti da eroina. La capacità dell'eroina a privilegiare la formazione della M6G ha importanti implicazioni cliniche dal momento che la M6G è un potente agonista oppioide. Una aumentata produzione di M6G, prolungando gli effetti prodotti della eroina, potrebbe contribuire a consolidare lo stato di dipendenza del soggetto nei confronti della droga piuttosto che favorirne l'adesione alla terapia sostitutiva. Circa il meccanismo del riarrangiamento metabolico prodotto dall'eroina, si può ipotizzare che esso sia ascrivibile a una modificata attività della UGT2B1 e/o UGT1A isoforme enzimatiche coinvolte oltre che nella glucuronazione della morfina anche in quella dell'estradiolo. In particolare la sintesi dell'estradiolo-3-glucuronide dipende dall'attività omodimerica dell'UGT1A1 secondo una cinetica di attivazione omotropica (coefficiente di Hill >1). Estendendo i nostri studi all'estradiolo, abbiamo osservato che l'eroina e il naltrexone riducono la sintesi dell'E3G spostando il coefficiente di Hill a un valore prossimo all'unità. Ciò suggerirebbe che l'eroina possa modulare il processo di glucuronazione attraverso una interazione specifica con l'isoforma UGT1A1.

RECIDIVA NELL'ABUSO DI ALCOL DOPO ESTINZIONE: MODELLI SPERIMENTALI E MECCANISMI NEUROCHIMICI

Massi M., Economidou D., Cippitelli A., Cifani C., Ciccocioppo R.

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Camerino

L'alcolismo è una malattia cronica caratterizzata da ricorrenti recidive nell'abuso di alcool dopo detossificazione; l'alta percentuale di ricadute costituisce una delle più importanti sfide per il trattamento della dipendenza da alcool. Due principali fattori contribuiscono alla persistenza dell'uso compulsivo di alcool e all'alto rischio di recidiva dopo un lungo periodo di astinenza: stimoli condizionati e stress. Il ruolo degli stimoli condizionati è dimostrato dall'osservazione che la recidiva è spesso associata all'esposizione a stimoli ambientali precedentemente associati al consumo di alcool. La recidiva nell'abuso di alcool può anche essere causata da esposizione a eventi stressanti. Il significato degli stimoli condizionati e dello stress come fattori che producono rischio di ricaduta è chiaramente evidente in modelli animali, in cui stimoli predittivi di presentazione dell'alcool (olfattivi, acustici o visivi) o stress da foot-shock elettrico inducono ricaduta nel comportamento di ricerca dell'alcool dopo estinzione dello stesso. La recente letteratura al riguardo dimostra che la reazione a stimoli condizionati è primariamente sotto il controllo dei sistemi dopaminergici, oppioidergici e glutamatergici. D'altro canto, le ricadute indotte da stress sono principalmente controllate dal sistema della corticotropina (CRF). Il trattamento farmacologico con antagonisti oppioidi non selettivi, quali il naloxone, inibisce la reazione a stimoli condizionati nel ratto e nell'uomo; il naloxone è però inattivo nella ricaduta indotta da stress. La nocicettina/orfanina FQ (N/OFQ), il ligando endogeno del recettore NOP, esercita un effetto antagonista nei confronti del sistema degli oppioidi endogeni e del CRF, inoltre modula la neurotrasmissione dopaminergica, noradrenergica e glutamatergica in diversi siti cerebrali tramite meccanismi di inibizione presinaptica. Studi condotti nel nostro dipartimento hanno dimostrato che l'attivazione dei recettori NOP da parte della N/OFQ o di agonisti NOP di sintesi riduce l'autosomministrazione di alcool, riduce la gratificazione da alcool o da morfina nel paradigma sperimentale della preferenza spaziale condizionata. Studi recenti hanno mostrato che la N/OFQ previene nel ratto anche la ricaduta nel comportamento di ricerca dell'alcool, dopo estinzione dello stesso, indotta sia da esposizione a stimoli ambientali associati all'alcool, sia da stress evocato da foot-shock elettrico. Tutte queste osservazioni suggeriscono che il sistema N/OFQ-recettore NOP possa rappresentare un target interessante per farmaci contro la recidiva nell'abuso di alcool.

LA SOMMINISTRAZIONE DI METILFENIDATO IN RATTI ADOLESCENTI DETERMINA MODIFICHE A BREVE E A LUNGO TERMINE SUI PROCESSI CEREBRALI DEL RINFORZO E L'ESPRESSIONE GENICA NELLA REGIONE DELLO STRIATO

Laviola G.¹, Adriani W.¹, Leo D.², Greco D.², di Porzio U.², Perrone-Capano C.²

¹Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma;
²Istituto di Genetica e Biofisica A. Buzzati Traverso, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli

La somministrazione di metilfenidato (MPH, Ritalin®) a bambini affetti da disordini attentionali con iperattività (ADHD) è prassi medica consolidata. Il fatto che tale farmaco agisca tramite le medesime vie neurochimiche attivate da sostanze d'abuso, quali cocaina e anfetamina, implica un serio rischio potenziale di sviluppo di alterazioni neuro-comportamentali. Uno dei principali sintomi dell'ADHD è la presenza di elevati livelli di impulsività. Nello studio qui riportato, sono stati analizzati comportamenti operanti, funzionali all'ottenimento di un rinforzo, in ratti adulti del ceppo Wistar, trattati in precedenza durante la fase adolescenziale (giorni post-natali 30-45) con MPH (2mg/kg al dì). Il gruppo di controllo aveva ricevuto una soluzione fisiologica. I soggetti venivano posti all'interno di gabbie sperimentali provviste, su una parete, di due fori delle dimensioni del muso del ratto. L'inserimento del muso in uno di questi fori era seguito dal rilascio immediato e garantito di una singola unità di cibo. Il secondo foro era associato invece a una quantità di cibo cinque volte maggiore. Tuttavia il rilascio di quest'ultima si verificava solo dopo un determinato ritardo di tempo, che veniva anche progressivamente aumentato durante le sessioni. L'aumentare dell'intervallo era funzionale alla possibilità di osservare profili di impulsività. Rispetto ai soggetti di controllo, ratti adulti precedentemente esposti a MPH in adolescenza presentavano un maggiore autocontrollo e quindi ridotta impulsività. Gli stessi soggetti esibivano inoltre (nel paradigma della *conditioned place preference*, CPP) una dissociazione tra i) una ridotta preferenza per un ambiente associato alle proprietà edoniche della cocaina rispetto ai controlli, e ii) un'augmentata sensibilizzazione invece agli effetti iper-cinetici della stessa sostanza. Al fine di identificare poi le modificazioni molecolari indotte dal trattamento con MPH, campioni di area cerebrale striatale, ottenuti sia a fine trattamento sia in età adulta, sono stati analizzati tramite una metodica di *genome-wide microarray* con validazione per *RT-PCR*. Questa analisi ha evidenziato come il trattamento con MPH induca, a breve termine, l'espressione di più di 700 geni nell'area dello striato. Molti di questi geni sono coinvolti nella codifica della famiglia di proteine (PSD) della plasticità sinaptica. Era presente inoltre un incremento nell'espressione di geni relativi a cinque recettori neurotrasmettitoriali. Per quanto riguarda le alterazioni permanenti, a due mesi dal termine del trattamento erano ancora presenti una sovra-regolazione dei geni codificanti la subunità kainato-2 del recettore glutammato e il recettore serotonergico 5-HT(7). Questi risultati dimostrano la presenza di modificazioni a breve

termine della plasticità neuronale che potrebbero, a loro volta, indurre alterazioni permanenti dei circuiti striatali coinvolti nella percezione degli stimoli gratificanti. Tali modifiche potrebbero dar conto del profilo comportamentale osservato in età adulta: a) ridotta percezione delle proprietà edoniche dello psicostimolante cocaina; b) incremento del controllo corticale di processi solitamente mediati da aree sotto-corticali. In conclusione, questi modelli possono essere di ausilio nello studio di nuove terapie farmacologiche indirizzate a soggetti in fase di sviluppo, e della valutazione delle possibili conseguenze a lungo termine.

ESPOSIZIONE A CANNABINOIDI IN FASI ONTOGENETICHE PRECOCI

Gaetani S., Cuomo V.

Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università degli Studi La Sapienza, Roma

La marijuana è una sostanza largamente abusata dalle donne in gravidanza. Purtroppo, a tutt'oggi, sono ancora insufficienti gli studi epidemiologici e clinici sugli effetti dell'esposizione prenatale a tale sostanza. Ciò deriva sia dalla convinzione che i cannabinoidi siano sostanze scarsamente tossiche, sia dalle difficoltà metodologiche intrinseche agli studi sull'uomo, legate ai numerosi fattori confondenti (condizioni socio-economiche, concomitante esposizione ad altre sostanze d'abuso, ecc.). In questo contesto, le indagini condotte su animali da laboratorio permettono di caratterizzare il rapporto causa-effetto tra l'esposizione pre- o peri-natale a cannabinoidi ed eventuali alterazioni neuro-funzionali nella progenie. Tali indagini hanno dimostrato l'esistenza di alterazioni dell'ontogenesi dell'attività locomotoria e del comportamento esplorativo, nonché anomalie nelle interazioni sociali, nelle capacità di orientamento e nel comportamento sessuale. Recenti studi hanno, inoltre, contribuito a definire il meccanismo responsabile di alterazioni cognitive prodotte nella progenie dall'esposizione prenatale a cannabinoidi. In tali studi sono stati analizzati gli effetti sulla funzione cognitiva della progenie di ratte esposte durante la gravidanza a basse dosi dell'agonista dei recettori CB1, WIN 55,212-2 (somministrato per via sottocutanea, alla dose di 0,5 mg/Kg dal 5° al 20° giorno di gestazione). I risultati hanno evidenziato che la somministrazione di WIN causa iperattività motoria nelle prime fasi di vita postnatale e induce alterazioni a lungo termine delle capacità di ritenzione di un programma di evitamento attivo e passivo. Esperimenti elettrofisiologici hanno evidenziato, nella progenie di ratte trattate con WIN, una significativa riduzione della fase di mantenimento della long term potentiation (LTP) ippocampale in assenza di modificazioni dell'eccitabilità sinaptica basale e dell'induzione della LTP. Parallelamente, esperimenti neurochimici *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che il trattamento prenatale con WIN produce una significativa riduzione del rilascio basale e stimolato (K^+) di glutammato nell'ippocampo e nella corteccia frontale di ratti di 1, 40 e 90 giorni di vita. Questi risultati suggeriscono che il ridotto rilascio di glutammato potrebbe essere responsabile delle alterazioni della LTP che a loro volta rappresenterebbero il substrato neuronale del deficit delle funzioni cognitive causato dalla somministrazione di WIN durante la vita prenatale.

Seconda Sessione Aula Marotta
Xenobiotici nella catena alimentare

Moderatori
M. Miraglia, P. Restani

PROBLEMI DI CONTROLLO QUALITÀ E SICUREZZA DI INTEGRATORI ALIMENTARI E PREPARAZIONI MAGISTRALI CONTENENTI ESTRATTI DI *COLEUS FORSKHOLII*

Restani P.¹, Marangon K.¹, Colombo M.L.²

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Torino

A causa del sempre crescente interesse per i prodotti naturali e per la continua e costante richiesta da parte degli utilizzatori, numerosi sono gli integratori alimentari e le preparazioni magistrali contenenti estratti vegetali ottenuti da piante anche non appartenenti alla nostra flora. Sovente è proprio l'elemento esotico che riscuote maggiore interesse da parte del pubblico, attratto dalle più svariate potenzialità salutistiche attribuite alle piante. Il caso di cui si riferisce è appunto correlato alla presenza di estratti di *Coleus forskholii* (Willd.) Briq. (Lamiaceae) pianta originaria dei Paesi asiatici, attualmente coltivata in modo intensivo soprattutto in India, per ricavarne estratti usati da sempre nella medicina ayurvedica e, più recentemente, in Occidente per le presunte capacità di aumentare, nell'organismo umano, la lipolisi e la termogenesi con conseguente supposto effetto dimagrante. Gli estratti vegetali di *Coleus* sono stati sottoposti alla nostra attenzione dal Comando Carabinieri per la Sanità, Nucleo Antisofisticazioni e Sanità di Milano (NAS) su segnalazione di alcuni Centri AntiVeleno (CAV). Nello specifico i casi di intossicazione (crisi anticolinergiche) sono stati ascritti a diversi prodotti, tutti contenenti lo stesso estratto di *Coleus* (importato dall'India): integratori alimentari con ingredienti erboristici (fialoidi), preparazioni magistrali (capsule), prodotti termogenici per sportivi (capsule). Scopo del nostro lavoro è stato quello di verificare la effettiva presenza di *Coleus* nell'estratto in questione e la presenza di sostanze, cui poter attribuire le crisi anticolinergiche evidenziate nei pazienti ricoverati. Le analisi sono state condotte mediante HPLC-UV e HPLC-Fluor, previa estrazione e preparazione del campione anche con cromatografia a scambio ionico. I risultati delle nostre analisi hanno permesso di verificare l'effettiva presenza di estratti di *Coleus* nel materiale esaminato. Tale materiale si presentava tuttavia contaminato dalla presenza di composti non appartenenti a *Coleus*: si trattava di alcaloidi a nucleo tropanico, caratteristici di piante della famiglia delle Solanacee, quali ad es. *Atropa*, *Duboisia*, *Datura*, ecc. Il caso qui descritto sottolinea il già noto problema del rischio associato ai prodotti erboristici, soprattutto quando vengano importati da Paesi in cui i sistemi di controllo qualità non sono sufficienti a garantire la sicurezza del consumatore. A questo proposito, una maggiore sensibilizzazione dovrebbe essere stimolata nelle ditte importatrici da parte degli organi di controllo.

ESPOSIZIONE ALIMENTARE A POLICLORODIBENZO- P-DIOSSINE, POLICLORODIBENZOFURANI E POLICLOROBIFENILI IN ITALIA

Fattore E.¹, Fanelli R.¹, Turrini A.², di Domenico A.³

¹Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano; ²Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Roma; ³Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'assunzione per via alimentare di dibenzo-*p*-diossine (PCDD), dibenzofurani (PCDF), e bifenili diossina-simili (DL-PCB) policlorurati a livello nazionale è stata valutata sulla base di dati inerenti il consumo degli alimenti e delle concentrazioni medie dei contaminanti d'interesse in alimenti comunemente disponibili sul mercato Europeo. L'obiettivo dello studio era quello di descrivere le distribuzioni dell'assunzione di PCDD, PCDF, e DL-PCB nella popolazione generale Italiana come parte del sistema Europeo, e di valutare quanto la variabilità delle abitudini alimentari possa influire sull'entità dell'assunzione. I risultati ottenuti individuano nel prodotto ittico il principale veicolo di PCDD, PCDF, e DL-PCB, con un contributo medio all'assunzione totale pari al 44%; il latte e i suoi derivati seguono nell'ordine con un contributo medio del 27%. L'assunzione giornaliera di PCDD, PCDF, e DL-PCB — TEQ totali è stata stimata mediamente in 5,34, 3,37, e 2,28 pgWHO-TE/kg-bw rispettivamente per le tre classi d'età 0–6 (escluso l'allattamento al seno), 7–12, and 13–94 anni; le variazioni positive dell'assunzione conseguenti variazioni delle abitudini alimentari appaiono essere in genere contenute entro un fattore pari a 2–3. Dall'esposizione media stimata per la popolazione generale adulta può dedursi che una parte consistente della medesima possa eccedere l'assunzione giornaliera tollerabile (TDI) di 2 pgWHO-TE/kg-bw.

RESIDUI DI ERITROMICINA NELLA TROTA IRIDEA D'ACQUACOLTURA

Esposito A.¹, Fabrizi L.¹, Lucchetti D.¹, Guandalini E.¹, Marvasi L.², Coni E.¹

¹Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi di Bologna, Ozzano Emilia

La produzione globale di acquacoltura sta crescendo dal 1970 con un incremento medio annuo del 9,7%, rispetto all'1,4% della pesca e al 2,8% della zootecnia tradizionale (FAO, 2002). Nel Mediterraneo, l'incremento medio annuo è passato negli ultimi 20 anni dal 4% al 13%, con un'enorme diversificazione delle specie allevate (da 18 specie nel 1981 a 40 nel 2001). Nell'ambito della piscicoltura, la trota iridea è la specie maggiormente allevata in Italia (62% della produzione nel 2002) e la seconda in Europa, dopo il salmone atlantico. L'aumento delle patologie negli allevamenti di tipo intensivo comporta un maggior uso di farmaci e disinfettanti. La lattococcosi, un'infezione da cocchi Gram positivi apparsa in Europa circa 15 anni fa, è considerata la principale responsabile del calo del 40% della produzione italiana di trote dell'ultimo decennio. L'eritromicina è il principio attivo d'elezione contro i germi Gram positivi, ma a oggi non è ancora registrata per l'acquacoltura in Italia. Per ovviare alla carenza normativa, è possibile ricorrere alla ricetta veterinaria in deroga, con imposizione di un tempo di sospensione minimo di 500 °C giorno (°C giorno=temperatura media x giorni), stabilito dalla Diretiva (CE) No. 82/2001. Lo scopo di questo studio è stato valutare il tempo necessario affinché i residui di eritromicina nei tessuti edibili (muscolo più pelle in proporzioni naturali) scendano sotto il valore di LMR (limite massimo di residuo) stabilito dal Reg. CEE 2377/90 per i prodotti ittici (200 µg kg⁻¹), in seguito a trattamento terapeutico (100 mg · Kg⁻¹ p.c. vivo · giorno⁻¹ per 21 giorni). Centoquaranta trote sono state allevate in vasche (T=11,5°C) e campionate a 0,1, 0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 30 giorni dalla fine del trattamento. I campioni omogeneizzati sono stati estratti con acetonitrile, sgrassati con n-esano e filtrati. I residui di eritromicina sono stati identificati e quantificati mediante LC-MS/MS. Il metodo è stato validato internamente secondo la Decisione (CE) No. 657/2002. I risultati mostrano che i residui di eritromicina scendono sotto il valore di LMR dopo 150°C giorno dalla fine del trattamento. Pertanto, il tempo di sospensione minimo di 500 °C giorno, imposto dalla CE per qualsiasi prodotto somministrato off-label in acquacoltura, sembra, per l'eritromicina nella trota iridea, superiore a quanto necessario per la sicurezza d'uso del prodotto. Lo studio descritto può essere utile ai fini della registrazione di eritromicina in acquacoltura, dove la carenza di farmaci autorizzati facilita l'uso improprio di sostanze chimiche.

L'EFFETTO DELL'AFLATOSSINA B₁ (AFB₁) SULL'ATTIVITÀ DELL'ACETILCOLINESTERASI (ACHE) E SULLE SUE ISOFORME ENZIMATICHE RAPPRESENTA UN NUOVO APPROCCIO ALLO STUDIO DELLE AFLATOSSICOSI *IN VITRO* E *IN VIVO* NEL TOPO

Cometa M.F.¹, Lorenzini P.¹, Volpe M. T.¹, Fortuna S.¹, Parisi L.¹, Palmery M.², Meneguz A.¹
¹Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia Vittorio Erspamer, Università degli Studi La Sapienza, Roma

Le Aflatossine (AFB), micotossine prodotte da alcuni ceppi di *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, rappresentano un serio rischio per la salute umana contaminando differenti derrate alimentari e accumulandosi in forma di metaboliti nei tessuti degli animali da fattoria. In particolare l'Aflatossina B₁ (AFB₁) è stata rilevata nel cervello, fegato, polmoni, reni e sangue di bambini deceduti a causa di non identificate patologie a carico del Sistema Nervoso Centrale. Tuttavia i principali studi condotti su AFB₁ sono focalizzati sugli aspetti di tossicità cronica a livello mutagenico, cancerogeno ed epatotossico. Più recentemente gli effetti sul sistema gastrointestinale, respiratorio, cardiovascolare e centrale sono stati riportati sia nell'uomo sia nell'animale in seguito a esposizione acuta alle comuni aflatossine. In considerazione del fatto che l'aflatossicosi acuta da AFB₁ nell'animale si manifesta con sintomi colinergici, in questo studio abbiamo esaminato gli effetti di questa micotossina sull'attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE) in seguito a esposizione *in vitro* e *in vivo* nel topo. Negli studi *in vitro* AFB₁ (1nM-100 µM) inibisce l'AChE cerebrale (IC₅₀=31,6 µM; IC₂₀=63 nM), serica (IC₂₀=9,12 µM) intestinale (ileo; IC₂₀=28 µM) ed entrambe le isoforme molecolari G₁ e G₄ in maniera dose-dipendente. L'esposizione acuta *in vivo* ad AFB₁ (gavage 5 e 10 mg/kg in olio) determina un marcato effetto inibitorio dell'attività dell'AChE epatica e serica e un effetto modulatorio differente nelle varie regioni cerebrali considerate. L'analisi cinetica dei dati e l'elaborazioni di Lineweaver-Burk e Dixon supportano l'ipotesi di un antagonismo misto di tipo noncompetitivo riconducibile a un legame dell'AFB₁ sia all'enzima libero sia al complesso enzima-substrato. L'enzima inibito dalla AFB₁ è parzialmente riattivato dalla piridina-2-aldossima ma il *time-course* di inibizione enzimatica dell'AFB₁ differisce da quello del Diisopropilfluorofosfato (DFP), potente inibitore dell'AChE agendo esclusivamente sul sito attivo dell'enzima. Tutti i nostri dati suggerirebbero che l'AFB₁ agisca bloccando l'accesso del substrato al sito attivo e/o inducendo una variazione conformazionale enzimatica attraverso un legame non covalente con il sito di legame periferico dell'AChE più sostanzialmente legato a funzioni non-colinergiche dell'AChE (regolazione dell'adesione cellulare). Le evidenze sia *in vitro* sia *in vivo* dopo esposizione all'AFB₁ indicherebbero nell'alterata attività dell'AChE un nuovo *target* tossicologico dell'AFB₁ fornendo un nuovo approccio allo studio della tossicità da AFB₁.

ACRILAMMIDE ASSUNTA ATTRAVERSO LA DIETA O L'ACQUA DA BERE: BIODISPONIBILITÀ RELATIVA NEL SUINO

Aureli F., Lucchetti D., Di Pasquale M., Fabrizi L., Aureli P., Coni E.
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel 2002 uno studio svedese mostrò che durante il processo di cottura a elevate temperature nei cibi ricchi di carboidrati (patatine fritte, pop-corn, biscotti, cereali da prima colazione, pane) si forma acrilammide. In alcuni alimenti i livelli di questa sostanza superano anche di 4 ordini di grandezza i limiti fissati dall'OMS per l'acqua potabile (0,1 µg/L). La valutazione della biodisponibilità di acrilammide assunta attraverso gli alimenti è una delle ricerche ritenute prioritarie dall'OMS, dal Comitato scientifico dell'UE e dall'FDA, al fine di valutare adeguatamente il rischio posto dall'assunzione attraverso la dieta di questa sostanza neurotossica e potenzialmente cancerogena. In questo studio di biodisponibilità relativa sono stati impiegati 25 suini (razza *Large White Italiana*) di sesso femminile. È stata scelta questa specie animale per le analogie con il peso corporeo, l'apparato cardiocircolatorio e la fisiologia digestiva dell'uomo. A 5 animali (D1) l'acrilammide è stata somministrata per 96 giorni in matrice alimentare mediante addizione al mangime di patatine fritte commerciali (contenenti acrilammide alla concentrazione di circa 1 mg kg⁻¹). Il livello scelto è stato pari all'esposizione media più elevata calcolata per l'uomo dall'OMS e dall'UE (0,8 µg kg⁻¹ p.c. giorno⁻¹). In parallelo, 5 animali (W1) hanno ricevuto mediante acqua da bere una dose di acrilammide equivalente alla D1, mentre ad altri 10 animali (D2 e W2) l'acrilammide è stata somministrata mediante mangime o acqua da bere a un livello (7,9 µg kg⁻¹ p.c. giorno⁻¹) circa 10 volte superiore al precedente. Infine, 5 animali (C) sono stati utilizzati come controllo. I prelievi dei campioni di sangue dalla vena giugulare dei suini sono stati condotti a 64, 71, 85, 92, 99, 106, 113, e 142 giorni dall'inizio del trattamento. Il marker di esposizione considerato in questo studio è stato l'addotto N-(2-carbamioetil) valina, che l'acrilammide forma legandosi all'emoglobina. L'addotto è stato derivatizzato secondo la reazione di Edman modificata e i suoi livelli misurati tramite gascromatografia con rivelazione di massa (GC/MS). Le concentrazioni d'addotto misurate nei suini cui l'acrilammide è stata somministrata attraverso matrice alimentare sono risultate statisticamente comparabili a quelle dei suini trattati tramite acqua da bere, a tutti i tempi e alle due dosi considerate. Ciò sembra indicare una biodisponibilità equivalente quando l'acrilammide viene assunta attraverso la dieta o l'acqua da bere. Il valore più elevato di addotto riscontrato (174 pmol g⁻¹ globina) è risultato molto inferiore al NOAEL riportato per la neurotossicità di acrilammide (510 pmol g⁻¹ globina).

EFFETTO DELL'ETANOLO PRESENTE NEL VINO ROSSO NELL'ASSORBIMENTO DELLA QUERCETINA IN INTESTINO ISOLATO DI RATTO

Dragoni S.¹, Gee J.², Bennett R.², Valoti M.¹, Sgaragli G.¹

¹*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Siena;* ²*Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich*

Una dieta ricca in frutta e verdura che includa un moderato consumo di vino, è associata con una bassa incidenza di patologie cardiovascolari e cancro. Questi effetti protettivi possono essere dovuti alla presenza di flavonoidi. Studi epidemiologici hanno evidenziato che individui che facevano un moderato consumo di vino presentavano un diminuito rischio di mortalità, ospedalizzazione e sintomi di patologie cardiovascolari in confronto a individui che non consumavano vino. È stato sottolineato, inoltre, che mentre un moderato consumo di vino ha una correlazione inversa con l'insulto ischemico, altre bevande alcoliche non hanno lo stesso effetto. Questo potrebbe essere dovuto all'elevato contenuto in polifenoli del vino e in particolare di quercetina, il più abbondante flavonolo nel regno vegetale. Alcuni autori hanno ipotizzato che la presenza di alcool nel vino rosso potrebbe aumentare la biodisponibilità dei flavonoidi aumentando il loro assorbimento intestinale. Lo scopo di questo studio è stato approfondire gli effetti dell'alcool nell'assorbimento intestinale della quercetina (Q) e del suo 3-O-glucoside (Q-3-G), presenti nel vino rosso, in preparazioni isolate di intestino di ratto revertito. Segmenti di 5 cm di intestino tenue rigirato sono stati incubati con: vino rosso, il suo analogo dealcolato e due soluzioni ricostituite contenenti sia Q che Q-3-G in presenza e in assenza di 6% etanolo. L'analisi della mucosa intestinale nei preparati incubati con il vino completo ha messo in evidenza un significativo incremento (circa 3 volte) nel contenuto di Q e Q-3-G rispetto alle preparazioni incubate con il vino dealcolato. Inoltre il contenuto dei metaboliti O-metilati, tamarixetina (T) e isoramnetina (I), era significativamente più alto nei preparati incubati con il vino completo. Ciò indicava che l'etanolo era in grado di condizionare il metabolismo della quercetina verso la formazione di questi composti a scapito dei rispettivi metaboliti glucuronide e solfato. In modo analogo la presenza di etanolo aumentava la concentrazione mucosale di Q quando gli intestini erano incubati con le soluzioni ricostituite. I dati ottenuti permettono di concludere che l'etanolo contenuto nel vino rosso può contribuire agli effetti benefici della quercetina incrementandone l'assorbimento e contemporaneamente stimolando la formazione di T e I, che sembrano avere un ruolo attivo nella prevenzione del cancro e di patologie cardiovascolari.

Questo lavoro è stato svolto nell'ambito del programma COST926.

OCTILFENOLO E NONILFENOLO IN PRODOTTI ITTICI DEL MAR TIRRENO: VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE E DEL RISCHIO PER LA POPOLAZIONE ITALIANA

Ferrara F.¹, Ademollo N.¹, Delise M.², Fabietti F.², Funari E.¹

¹Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità Roma; ²Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e dei Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Lo studio ha valutato la presenza di octilfenolo (OF) e nonilfenolo (NF) in 6 specie di prodotti ittici, *Squilla mantis* (pannocchia), *Octopus vulgaris* (polpo), *Engraulis encrasicolus* (acciuga), *Scomber scombrus* (sgombro), *Diplodus sargus sargus* (sarago), *Lythognathus mormyrus* (mormora), *Mullus barbatus* (triglia), e *Thynnus thynnus* (tonno) pescati tra Ottobre e Dicembre 2003 lungo la costa italiana del Mar Tirreno. Sono stati scelti 3 siti di campionamento nei quali era sospettata la presenza di alchilfenoli (AF) perché in prossimità della foce di tre fiumi: l'Arno, che attraversa un importante distretto tessile; il Tevere, che è il secondo fiume d'Italia per bacino idrografico e non ultimo attraversa la città di Roma; il Sarno, che è tra i fiumi più inquinati d'Italia. Lo scopo della ricerca è stato quello di misurare la presenza dell'OF e del NF nei prodotti ittici del Mar Tirreno e più in generale vedere quale dei tre fiumi contribuiva a determinarne i livelli più alti, ma anche fornire ulteriori elementi necessari per valutare con maggiore accuratezza il possibile rischio per la salute umana. Sia il NF che l'OF sono stati trovati in tutti i campioni rispettivamente ai livelli di 9-3391, <0,5-57 ng/g fw nei pesci, 6-2089, <0,5-5 ng/g fw nei crostacei e 10-22, 0,1-0,5 ng/g peso umido nei molluschi. Questi valori sono generalmente inferiori a quelli ritrovati nelle stesse specie del Mare Adriatico a eccezione di quelli pescati nel tratto di mare antistante Fiumicino (sotto l'influenza del Tevere) che hanno mostrato livelli di alchilfenoli più elevati, in particolare di NF. I risultati di questa ricerca suggeriscono un possibile maggiore contributo del fiume Tevere nel determinare le concentrazioni elevate di AF nei prodotti ittici, probabilmente a causa degli scarichi della città di Roma. Sulla base dei livelli di NF registrati nei campioni è possibile stimare una concentrazione nell'acqua marina di 7-2648 µg/L. Questi livelli appaiono decisamente più elevati della PNEC (Predicted No Effect Concentration) stabilita dall'Unione Europea per il NF, ma anche del Water Quality Criteria dell'US EPA di 1,4 µg/L. Infine, considerando un consumo medio di prodotti ittici in Italia di 31,8 g/persona/giorno, che le specie considerate rappresentino il consumo complessivo di prodotti ittici e una concentrazione media di NF di 383 µg/kg, è possibile stimare un'assunzione totale di NF pari a 12 µg/persona/giorno. Tale assunzione risulta di gran lunga inferiore al NOAEL per il NF di 1,5 mg/kg/giorno stabilito dall'Unione Europea.

EFFETTI DI DUE FUSARIOTOSSINE SU CELLULE JURKAT: STUDIO *IN VITRO*

Luongo D.^{1,2}, Severino L.¹, Bergamo P.², De Luna R.³, Lucisano A.¹, Rossi M.²

¹Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione Tossicologia, Università degli Studi di Napoli Federico II; ²Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Avellino; ³Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Sezione di Clinica Medica, Università degli Studi di Napoli Federico II

Introduzione - Le micotossine, contaminanti alimentari di origine fungina ampiamente diffusi, costituiscono un grave rischio per la salute dell'uomo e degli animali. La fumonisina B1 (FB1) e lo zearalenone (ZEA) sono micotossine prodotte da miceti del genere *Fusarium*, frequentemente rinvenute come co-contaminanti nei cereali e prodotti alimentari derivati. A entrambe le micotossine, oltre a specifici effetti tossici su organi e apparati, vengono attribuiti effetti sul sistema immunitario. Tuttavia, mentre sono ampiamente descritti in letteratura gli effetti sul sistema immune dovuti alle singole micotossine, del tutto carenti appaiono gli studi relativi a una contemporanea esposizione a più fusariotossine. In considerazione di ciò, tale studio si propone di valutare gli effetti di una co-incubazione delle due micotossine in cellule Jurkat, attraverso la valutazione della proliferazione cellulare e della cinetica di produzione di due citochine utilizzate come markers di funzionalità linfocitaria.

Materiali e Metodi: Cellule Jurkat, coltivate in condizioni sperimentali standard, sono state incubate con concentrazioni crescenti di FB1 e di α -zearalenolo (α -ZEA), metabolita attivo dello zearalenone, sia singolarmente che in combinazione. L'andamento della proliferazione cellulare è stato valutato aggiungendo [³H]-timidina e analizzando l'incorporazione di radioattivo nel DNA neosintetizzato, la tossicità cellulare è stata determinata mediante l'analisi dell'attività della caspasi 3 e del rilascio di LDH, mentre la cinetica di produzione della IL-2 e dell'IFN- γ , è stata valutata mediante analisi RT-PCR nelle cellule stimulate con mitogeno.

Risultati e Conclusioni: l'analisi proliferativa indica che FB1 stimola la proliferazione delle cellule Jurkat, mentre α -ZEA induce un marcato effetto inibitorio; in entrambi i casi l'effetto è dose-dipendente. Nella co-incubazione, l'effetto induttivo esercitato dalla FB1 viene completamente annullato da quello inibitorio indotto da α -ZEA. Inoltre, la combinazione di concentrazioni crescenti di FB1 con concentrazioni costanti di α -ZEA produce una progressiva, e statisticamente significativa, riduzione della proliferazione cellulare. La valutazione del pattern di citochine indica che FB1 non modifica l'espressione dei trascritti della IL-2 e dell'IFN- γ , mentre α -ZEA produce una riduzione dei trascritti di entrambe le citochine. Nella co-incubazione, invece, i livelli dei trascritti appaiono minori rispetto a quelli espressi con l'esposizione ad α -ZEA da sola. In conclusione, i risultati ottenuti evidenziano la diversa capacità immunomodulatoria delle due fusariotossine quando somministrate singolarmente, viceversa mostrano un potenziamento dell'attività inibitoria di α -ZEA nella co-incubazione. L'effetto sinergico descritto assume particolare rilevanza in considerazione dell'attività estrogeno-simile attribuita ad α -ZEA e, allo stesso tempo, va attentamente considerato nella definizione dei limiti di sicurezza delle singole micotossine negli alimenti.

Terza Sessione Aula Pocchiari
Neurotossicità

Moderatori
G. Calamandrei, E. Corsini

BDNF (BRAIN DERIVED NEUROTHROPHIC FACTOR) COME ESECUTORE DELL'EFFETTO NEUROPROTETTIVO DI ERITROPOIETINA

Bartesaghi S.¹, Viviani B.¹, Corsini E.¹, Villa P.^{2,3}, Ghezzi P.², Garau A.², Galli C.L.¹, Marinovich M.¹

¹Laboratorio di Tossicologia e Centro d' Eccellenza per le Malattie Neurodegenerative, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano; ²Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano; ³Istituto di Neuroscienze, Sezione di Farmacologia Cellulare e Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano

Eritropoietina (EPO), una citochina emopoietica che promuove la sopravvivenza e la differenziazione di cellule eritroidi, è anche un potente promotore della neuroprotezione. In colture primarie di neuroni di ippocampo di ratto, EPO alla concentrazione di 10 U/ml, riduce di ~50% la morte neuronale indotta da un neurotossico selettivo quale trimetilstagno (TMT), aumentando inoltre, con un andamento tempo-dipendente l'espressione di mRNA del BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Abbiamo quindi valutato se BDNF potesse mediare l'effetto neuroprotettivo di EPO. Per verificare se l'aumentata trascrizione genica di BDNF determinasse un'aumentata sintesi di BDNF biologicamente attivo, abbiamo valutato l'attivazione del recettore specifico per BDNF (TrkB) misurandone la fosforilazione. Il trattamento con EPO 10 U/ml aumenta significativamente la fosforilazione del recettore TrkB dopo 18 h. L'attivazione del recettore TrkB indotta da EPO è abolita da un anticorpo anti-BDNF (15 µg/ml) così come la protezione dal danno da TMT, confermando l'importanza della neurotrofina nel mediare l'effetto protettivo di EPO. Numerose evidenze riportano come l'espressione di BDNF in cellule neuronali sia indotta attraverso l'attivazione dei canali al calcio voltaggio operati di tipo L (L-VSCCs) e al susseguente reclutamento di fattori di trascrizione calcio dipendenti. Il trattamento dei neuroni ippocampali con 10 U/ml di EPO induce un aumento significativo dei livelli di calcio intracellulare dopo 5 minuti e una significativa fosforilazione in Ser133 del fattore di trascrizione CREB (cAMP response element binding protein) dopo 30 minuti. Entrambi gli effetti sono aboliti dall'utilizzo di nitrendipina 1 µM, un bloccante selettivo dei canali al calcio voltaggio operati di tipo L. Questi dati evidenziano quindi come EPO sia in grado di modulare la sopravvivenza neuronale attivando la via trascrizionale di CREB e incrementando l'espressione e la produzione di BDNF.

ESPOSIZIONE PERINATALE A DELTA9-TETRAIDROCANNABINOLO NEL RATTO: EFFETTI COMPORTAMENTALI E NEUROCHIMICI

Campolongo P.¹, Cassano T.², Trezza V.¹, Morgese M.G.³, Ferraro L.⁴, Tanganelli S.⁴, Cuomo V.¹

¹*Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Università degli Studi La Sapienza, Roma;* ²*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia;* ³*Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università degli Studi di Bari;* ⁴*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Ferrara*

Nonostante sia stato ampiamente dimostrato che l'esposizione a dosi elevate di marijuana durante la gravidanza possa indurre diverse alterazioni nella progenie, poca attenzione è stata dedicata agli effetti indotti dall'esposizione perinatale a dosi moderate di cannabinoidi. A tal proposito, recenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato come l'esposizione prenatale a dosi moderate di WIN 55,212-2, agonista sintetico dei recettori cannabinoidi, provochi nella progenie alterazioni a lungo termine delle funzioni cognitive correlate a un'alterazione della LTP e del rilascio ippocampale e corticale di glutammato. Tuttavia, il profilo d'azione del principale componente psicoattivo della marijuana, il delta9-tetraidrocannabinolo (THC), sembra essere per molti versi diverso da quello dei cannabinoidi di sintesi. Di conseguenza, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare nella progenie adulta gli effetti indotti dall'esposizione perinatale a una dose moderata di THC (5 mg/kg/die p.o.) sui processi cognitivi. Visto l'importante ruolo che la corteccia cerebrale svolge nella modulazione di tali processi, gli studi comportamentali sono stati affiancati da esperimenti di microdialisi volti a valutare gli effetti dell'esposizione a THC sulla neurotrasmissione corticale. Infine, poiché il sistema cannabinoide svolge un ruolo chiave nella modulazione degli stati di ansia, abbiamo inoltre valutato nella progenie gli effetti indotti dall'esposizione perinatale a THC sulla reattività emozionale. L'esposizione a THC ha indotto sottili deficit neurofunzionali in assenza di manifeste malformazioni o evidenti segni di tossicità. In particolare, il THC ha provocato un'alterazione dei processi cognitivi nei test di "inhibitory avoidance" ($p < 0,01$) e di "social discrimination" ($p < 0,001$), inoltre i livelli extracellulari di glutammato e noradrenalina ($p_s < 0,01$) sono risultati essere inferiori nel gruppo di animali esposti perinatalmente a THC rispetto al relativo gruppo di controllo. Infine, l'esposizione perinatale a THC ha provocato nella progenie alterazioni della reattività emozionale, come evidenziato dall'incremento del numero di vocalizzazioni ultrasoniche ($p < 0,05$) e dall'alterato profilo comportamentale nell'"elevated plus maze" (% di tempo trascorso nei bracci aperti, numero di HDIPS e SAP, $p < 0,01$; % di entrate nei bracci aperti, $p < 0,05$). Nel complesso, i nostri risultati dimostrano come l'esposizione perinatale a THC induca nella progenie deficit cognitivi associati a un'alterata neurotrasmissione corticale. Inoltre, in accordo con recenti evidenze cliniche, dai nostri studi è emerso che il trattamento perinatale con THC provoca nella progenie alterazioni a lungo termine della reattività emozionale.

RUOLO DELLO SCAMBIATORE Na^+ - Ca^{2+} NELL'INCREMENTO DI CALCIO INTRACELLULARE E NEL DANNO NEURONALE INDOTTI DAI POLICLORURATI BIFENILI IN CELLULE DI NEUROBLASTOMA UMANO SH-SY5Y

Magi S., Castaldo P., Carrieri G., Di Renzo G., Amoroso S.
Sezione di Farmacologia, Dipartimento di Neuroscienze, Università Politecnica delle Marche, Ancona

I policlorurati bifenili (PCB) sono dei contaminanti in grado di persistere nell'ambiente per lunghi periodi di tempo. Questi composti presentano un complesso spettro di proprietà tossicologiche, tra cui la neurotossicità. Il meccanismo attraverso cui i PCB inducono neurotossicità non è stato completamente chiarito, sebbene di recente sia stato proposto che possano determinare un'alterazione dell'omeostasi del calcio. Lo scambiatore sodio-calcio (NCX), un antiporto localizzato a livello della membrana plasmatica, costituisce un sistema molto importante per quanto riguarda il controllo dell'omeostasi del calcio. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare il coinvolgimento di NCX nell'incremento della concentrazione di calcio intracellulare ($[Ca^{2+}]_i$) e nel danno neuronale indotti dall' Aroclor 1254 (A1254), una miscela di PCB, in cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y. Misurazioni effettuate utilizzando il FURA 2 hanno messo in evidenza che l'A1254 (10-50 microg/ml) era in grado di indurre un incremento della $[Ca^{2+}]_i$ in maniera dose dipendente. La presenza di inibitori piuttosto specifici di NCX, il bepridil (10 microM) e il KB-R7943 (10-30 microM), era in grado di ridurre l'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ indotto dall'A1254 del 42% e del 52%, rispettivamente. La valutazione dell'attività mitocondriale (saggio MTT), quale indice di vitalità cellulare, mostrava che in cellule SH-SY5Y l'esposizione per 24 ore all'A1254 (30 microg/ml) determinava una marcata riduzione della vitalità cellulare. Tale danno veniva prevenuto dalla presenza degli inibitori bepridil e KB-R7943. Questi risultati suggerivano una partecipazione di NCX nell'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ e nel danno neuronale indotti dall'A1254. Esperimenti di RT-PCR evidenziavano l'espressione delle isoforme NCX1 e NCX3 nelle cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. Al fine di confermare il coinvolgimento di NCX nell'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ e nel danno neuronale indotti dall'A1254, sono stati utilizzati oligodeossinucleotidi antisenso (ODN) in grado di ridurre l'espressione delle proteine NCX1 e NCX3 in maniera specifica. I risultati ottenuti mostravano che l'ODN diretto contro NCX1 era in grado di ridurre sia l'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ che il danno neuronale indotti dall'A1254, laddove l'ODN diretto contro NCX3 non produceva alcun effetto. In conclusione questi risultati suggeriscono che in cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y, NCX1 gioca un ruolo importante nell'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ e nella neurotossicità indotti dall'A1254.

IL-BETA E RECETTORE NMDA CONCORRONO NELLA NEUROTOSSICITÀ INDOTTA DALLA GLICOPROTEINA DEL VIRUS HIV, GP120

Viviani B.^{1,2}, Gardoni F.², Bartesaghi S.^{1,2}, Corsini E.^{1,2}, Galli C.L.^{1,2}, Di Luca M.², Marinovich M.^{1,2}

¹Laboratorio di Tossicologia, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano; ²Centro di Eccellenza delle Malattie Neurodegenerative, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) si accompagna spesso a forme di demenza caratterizzate da comparsa di deficit cognitivi e motori correlati a semplificazione sinaptica e morte neuronale. In generale, il danno neuronale è sostenuto dall'attivazione gliale e dal rilascio sia di proteine virali, quali gp120, che di fattori gliali neurotossici (es. Citochine pro-infiammatorie). Questi eventi concorrono, con meccanismo ancora sconosciuto, a potenziare la funzionalità del recettore NMDA e indurre un danno di tipo eccitotossico. Mediante l'impiego di co-culture primarie di glia e neuroni abbiamo valutato il ruolo della citochina pro-infiammatoria IL1-beta nel danno neuronale indotto da gp120. L'esposizione della co-cultura a 600pM gp120 per 24h aumenta significativamente la fosforilazione in tyr1472 della subunità NR2B del recettore NMDA. Questo effetto è evidente solo in seguito a trattamento dei neuroni in presenza di glia ed è abolito dall'antagonista recettoriale di IL1-beta (IL1ra, 10 µg/ml), suggerendo il coinvolgimento di IL1-beta rilasciata in seguito ad attivazione gliale. L'aumentata fosforilazione della subunità NR2B risulta quindi in: (i) un aumento significativo dei livelli di Ca²⁺ intraneuronale, abolito da 10µM ifenprodil (inibitore selettivo per NR2B), (ii) una stabilizzazione del recettore NMDA a livello della membrana sinaptica, come evidenziato dall'aumentato legame tra NR2B e PSD-95 dopo 24h di trattamento con 600pM gp120. Entrambi questi effetti sono aboliti dall'inibitore specifico della famiglia delle tyr-Src chinasi pYEEIE (10µg/ml) e da IL1ra, confermando il coinvolgimento di IL1-beta nella tossicità indotta da gp120. Prolungando fino a 48h l'esposizione della co-cultura a 600 pM gp120, si osserva una riduzione pari a circa il 35% delle spine PSD-95 positive e comparsa di morte neuronale. Entrambi questi effetti sono bloccati dall'inibitore pYEEIE. In conclusione, gp120 induce fosforilazione in tyr1472 della subunità NR2B del recettore NMDA attraverso il rilascio gliale di IL1-beta. Questo effetto provoca stabilizzazione in membrana e potenziamento della funzionalità del recettore NMDA contribuendo sia al semplificazione sinaptica che alla morte neuronale indotte dalla glicoproteina.

IL FARMACO ANTIBLASTICO IDROSSIUREA INDUCE L'ESPRESSIONE GENICA DI CITOCINE PRO- INFIAMMATORIE IN ESPIANTI IPOTALAMICI E IN COLTURE PRIMARIE DI ASTROCITI E MICROGLIA DI RATTO

Navarra P., Tringali G., Fabricio A.S.C., De Simone M.L., Vairano M., Pozzoli G., Preziosi P.
Istituto di Farmacologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

Il nostro gruppo ha in precedenza dimostrato che l'idrossiurea (IU) produce una forte attivazione corticosurrenalica nel ratto dopo somministrazione orale singola o ripetuta. L'aumento dose-dipendente dei livelli di corticosterone proteggeva gli animali dalla tossicità di IU; infatti, animali con ablazioni dell'ipofisi o del surrene presentavano una mortalità del 80-100% dopo 5 giorni di trattamento con 300-800 mg/kg. L'associazione di attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) in animali integri e mortalità in animali ipofisectomizzati o surrenectomizzati suggeriva il coinvolgimento di citochine pro-infiammatorie quali interleuchina-1 e -6 (IL-1, IL-6), che possiedono il medesimo profilo di azioni neuroendocrine e tossiche. In effetti, abbiamo successivamente dimostrato che l'IU aumenta in modo significativo l'espressione genica di IL-1 e IL-6 nella milza di ratti surrenectomizzati, mentre lo stesso non avveniva in animali integri. Mentre questi dati spiegano le cause della aumentata tossicità in animali surrenectomizzati, resta da spiegare il meccanismo dell'attivazione dell'asse nei ratti normali. L'IU attraversa la barriera emato-encefalica, e un aumento dell'espressione genica e produzione di IL-1 e IL-6 a livello ipotalamico potrebbe causare l'aumento della secrezione di corticotropin-releasing hormone (CRH), il principale regolatore delle risposte acute dell'asse IIS agli stress. In questo studio abbiamo trattato espianti ipotalamici di ratto, secondo una tecnica descritta altrove, con medium da solo (controlli) o medium contenente IU 1 mM in esperimenti di 1 e 3 ore. Abbiamo osservato che IU induce un aumento significativo dell'espressione genica di IL-1 β (+73,3%, $p < 0,05$) e di IL-6 (+190,5%, $p < 0,01$) dopo 3 ore di incubazione. Abbiamo poi trattato colture primarie di microglia o astrociti di ratto per vedere se l'effetto di IU sull'ipotalamo in toto potesse essere attribuito a una azione sulla componente gliale, ma in questo paradigma l'induzione genica indotta da IU non si osservava prima di 6 ore di incubazione. Abbiamo infine valutato l'ipotesi che l'aumento dell'espressione genica di IL-1 e -6 nell'ipotalamo fosse secondario a un aumentata produzione di nitrossido (NO) secondaria a biotrasformazione di IU. Tuttavia, i livelli di NO nel mezzo di incubazione degli espianti ipotalamici non sono aumentati da 1 mM IU in esperimenti fino a 3 ore di incubazione.

RIDUZIONE, NEL RATTO, DELLE CONCENTRAZIONI DI BDNF (*BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR*) INDOTTA DA STEROIDI ANABOLIZZANTI

Scaccianoce S., Pace S., Togna G.I.

Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia Vittorio Erspamer, Università degli Studi La Sapienza, Roma

Tra le sostanze utilizzate nel mondo dello sport al fine di migliorare la performance sportiva, gli steroidi anabolizzanti androgeni (AAS), quali 19-nortestosterone o nandrolone, stanozololo, ossandrolone, ossimetolone, rappresentano quelli di più largo consumo. L'abuso di queste sostanze è spesso associato a gravi effetti avversi di natura cardiovascolare. Inoltre, è stata recentemente osservata un'associazione tra abuso di AAS e disturbi psichiatrici, quali, a esempio, depressione e comportamento maniaco. Il Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) ha attratto negli ultimi anni un considerevole interesse scientifico sulla base del dimostrato coinvolgimento (per riduzione cerebrale di BDNF) in varie patologie neurologiche. A conforto di questa tesi, la dimostrazione che il trattamento farmacologico antidepressivo è in grado di aumentare la disponibilità centrale di BDNF. Su queste basi, il nostro lavoro ha preso in esame l'effetto di un trattamento cronico (4 settimane) con stanozololo (5 mg/kg i.p.) o con nandrolone (5 mg/kg i.p.) sulle concentrazioni cerebrali e circolanti di BDNF nel ratto Wistar maschio. Inoltre, in considerazione dell'aumentato consumo di AAS nell'età adolescenziale, la ricerca è stata realizzata sia in ratti di 30 giorni che di 90 giorni d'età. Le concentrazioni di BDNF sono state misurate tramite metodica ELISA in omogenati ippocampali e corticoprefrontali, nel siero tal quale e dopo attivazione piastrinica. In entrambi i gruppi di età, il trattamento con AAS non ha evidenziato differenze nelle curve di accrescimento corporeo, così come nel *gross behaviour* e nelle concentrazioni circolanti di BDNF. Al contrario, una significativa riduzione delle concentrazioni di BDNF è stata osservata sia nell'ippocampo che nella corteccia prefrontale nel gruppo dei ratti adolescenti (30 giorni) e in quello degli adulti (90 giorni). In conclusione, in considerazione del ruolo esercitato dal BDNF, i risultati del presente lavoro suggeriscono che questa neurotrofina possa giocare un ruolo importante nei disturbi funzionali e/o neurodegenerativi del SNC, talvolta presenti in soggetti utilizzando a scopo doping steroidi anabolizzanti androgeni.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute ("Programma di ricerca 2004 sui farmaci, sulle sostanze e pratiche mediche utilizzabili a fine di doping nelle attività sportive")

Terza Sessione Aula Bovet
Tossicologia *in vitro*

Moderatori
P. Prieto, A. Stammati

NUOVI STRUMENTI PER STUDI DI RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITÀ

Benigni R., Bossa C.

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,
Roma*

La conoscenza generale sulle relazioni tra struttura chimica e attività biologica, assieme ai modelli teorici di Relazioni Quantitative Struttura-Attività (QSAR), costituiscono un vasto *corpus* scientifico che aiutano sia nella comprensione dei meccanismi di azione tossica che nella stima del rischio posto dalle sostanze chimiche. Un punto cruciale è ovviamente come immaginare progressi ulteriori. Una area dove tale sviluppo è immaginabile è quella della generazione di banche dati intelligenti. Un potente strumento in questo campo è costituito dalle banche dati chimiche relazionali. Tali banche dati contengono, oltre ai dati tossicologici, anche le strutture chimiche in formati leggibili da programmi che calcolano descrittori molecolari. Inoltre permettono di fare ricerche incrociando domande tossicologiche con domande chimiche. Sarà presentata la banca dati: "Cancerogeni chimici: strutture e dati sperimentali" costruita da noi, e presente nel sito del nostro dipartimento. I dati sono contenuti in file scaricabili liberamente all'indirizzo <http://www.iss.it/ampp/hhhh/hhhh.php?id=233>.

IL COMET TEST QUALE MEZZO DI EVIDENZA DEL DANNO APOPTOTICO

Marabini L., Frigerio S., Chiesara E., Radice S.
Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica E. Trabucchi, Università degli Studi di Milano

Il comet test è una tecnica elettroforetica per evidenziare la frammentazione del DNA a livello della singola cellula. È una tecnica sensibile per evidenziare siti alcalo labili, rotture a singolo e doppio filamento, in genere danni che sono indotti da agenti genotossici e mutageni. Il tipo di migrazione del nucleo, l'intensità di fluorescenza, la lunghezza della coda che si forma sono correlati al numero di frammenti di DNA che migrano con velocità diverse rispetto al nucleo intatto. Tale tecnica elettroforetica può essere utilizzata per evidenziare anche un processo apoptotico visto che la frammentazione del DNA è un evento importante nella fase finali di questo processo. Per una corretta valutazione del danno genotossico è quindi importante capire e poter valutare quanto gli eventi apoptotici si sovrappongano e diano falsi positivi od overespressione di danno. Per questo scopo sono stati confrontati gli effetti di sostanze tipicamente apoptotiche, genotossiche o stimoli necrotici su due cloni della linea cellulare MCF7, rispettivamente uno sensibile e l'altro resistente all'apoptosi, utilizzando analisi FACS e comet test neutro e alcalino. I nostri dati indicano chiaramente che il comet test condotto in ambiente alcalino (comet alcalino) evidenzia il danno al DNA conseguente allo shock termico (20-30 minuti a 56°C) in entrambi i cloni cellulari, mentre non è indicativo per evidenziare un danno indotto da uno stimolo tipicamente apoptotico per questo tipo di cellule (Taxolo 10 nM). Il comet test eseguito in ambiente neutro (comet neutro) evidenzia frammentazione del DNA dopo trattamento con l'agente apoptogeno (Taxolo 10nM) solo nel clone sensibile all'apoptosi, confermata con analisi FACS e liberazione dei ROS. Questi dati, in accordo con dati di letteratura su una diversa linea cellulare, indicano che il comet in ambiente neutro è la tecnica più adatta per evidenziare rotture a doppio filamento del DNA tipiche delle fasi finali dell'apoptosi e che il comet alcalino è da considerare un test specifico per l'evidenza di danno unicamente genotossico (rotture a singolo filamento).

STUDI *IN VITRO* SULLE INTERAZIONI FRA FLUOROCHINOLONI E ENZIMI FARMACOMETABOLIZZANTI EPATICI NEL CONIGLIO E NEL RATTO

Cantiello M., Dacasto M., Carletti M., Cagnardi P.¹, Carli S.¹, Nebbia C.

¹Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino; ²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano

Il derivato fluorochinolonico enrofloxacin (ENF) è uno degli antibatterici ad ampio spettro più usati in medicina veterinaria, mentre il suo metabolita N-deetilato ciprofloxacina (CIPR) è largamente impiegato in umana. È noto come nell'uomo e nel cane i fluorochinOLONI possano determinare l'insorgenza di interazioni farmacologiche soprattutto con alcuni substrati del CYP1A. In precedenti esperimenti avevamo dimostrato come nel coniglio – specie nella quale l'ENF è registrato – la somministrazione di ENF (Baytril®) *per os* per 5 giorni a dosi rispettivamente di 5 mg/kg p.c. (dose terapeutica) o di 25 mg/kg p.c. aveva determinato una riduzione dose-dipendente dell'etossiresorufina O-deetilasi (EROD) e della glutatione S-transferasi (GST) avente come substrato l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Allo scopo di approfondire i meccanismi di tali inibizioni, sono stati condotti studi *in vitro* con frazioni subcellulari epatiche di conigli di controllo o indotti con β -naftoflavone (β -NAF); in alcuni esperimenti sono state impiegate anche analoghe preparazioni di ratto. L'incubazione di frazioni microsomiali epatiche di entrambe le specie con concentrazioni scalari di ENF e CIPR ha determinato una riduzione dell'attività dell'EROD evidente soltanto alle concentrazioni più elevate (1-2 mM). In entrambe le specie, l'impiego di frazioni di animali pre-trattati con β -NAF e/o la pre-incubazione con un sistema NADPH-rigenerante non ha modificato in maniera significativa i risultati ottenuti con frazioni microsomiali epatiche di animali non indotti. In ogni caso l'attività inibitrice dell'ENR è risultata minore di quella del CIPR; a sua volta, l'entità dell'inibizione esercitata da quest'ultimo (1 mM) è risultata nettamente inferiore rispetto a quella esercitata dal benzo(a)pirene (0,5 mM), tipico substrato del CYP1A. L'impiego di concentrazioni di ENF nell'intervallo 0,125 - 1 mM ha determinato un'inibizione relativamente marcata della GST-CDNB, che ha permesso di calcolare un IC₅₀ pari a circa 0,3 mM. Gli studi relativi alla cinetica di inibizione (Dixon plot) hanno evidenziato un meccanismo di inibizione non competitiva nei confronti del GSH e incompetitiva nei confronti del CDNB. Sono in corso ulteriori indagini per valutare l'entità del coinvolgimento del CYP1A nel metabolismo ossidativo dell'ENR e gli effetti del CIPR sulla GST-CDNB.

Lavoro realizzato in parte con Fondi Ricerca Locale dell'Università degli Studi di Torino.

CONFRONTO TRA DUE TEST *IN VITRO* PER LA VALUTAZIONE DEL POTENZIALE EMOLITICO: APPROCCIO STATICO E DINAMICO

Casartelli A., Bonato M., Masotto I., Vandin L.
Safety Assessment Department., GSK Research Centre, Verona

Il test di emolisi *in vitro* è normalmente impiegato durante la fase preclinica di sviluppo dei farmaci, a supporto della somministrazione in vena nelle specie precliniche e nell'uomo. Diversi test sono descritti in letteratura. In questo lavoro, è stato usato sangue umano per confrontare due differenti metodiche: l'approccio "statico" che prevede l'incubazione per 10 minuti a 37°C di volumi uguali di formulazione e sangue, e il test "dinamico" in cui le formulazioni sono incubate per 30 secondi con il sangue in una proporzione che simula l'infusione in vena. Nei due test sono state adottate le stesse condizioni sperimentali: nel test dinamico, in cui le proporzioni formulazione/sangue simulano la somministrazione in vena, sia la velocità di infusione che la velocità stimata del flusso sanguigno nel sito di infusione sono state impostate a 8 mL/min, che analogamente al test statico corrisponde all'incubazione di miscele di volumi uguali di formulazione e sangue. In entrambi i test, dopo il periodo di incubazione, la reazione di emolisi è stata bloccata diluendo il campione con soluzione di glucosio al 5%. Il potenziale emolitico è stato valutato misurando il rilascio di emoglobina e potassio nei campioni di plasma ottenuti dopo centrifugazione dei campioni di sangue incubati con le formulazioni. In dettaglio, la lisi degli eritrociti è misurata dal rilascio di emoglobina, mentre il rilascio di potassio misura l'aumento della permeabilità di membrana. I risultati hanno dimostrato una buona sensibilità del rilascio di emoglobina solo nel test statico; tuttavia nel test dinamico, oltre a simulare i rapporti volumetrici tra formulazione e sangue che si verificano in vena, il rilascio di potassio ha dimostrato una ben maggiore sensibilità, permettendo l'evidenza di un rilascio a dosi di farmaco inferiori a quelle che causano la lisi degli eritrociti. Un test di emolisi *in vitro* che combini la sensibilità del test dinamico con l'affidabilità di quello statico rappresenta quindi l'opzione preferibile: in questo modo si potrebbero valutare in un unico test sia la effettiva lisi degli eritrociti, sia l'effetto del farmaco sul flusso di potassio negli eritrociti in condizioni che simulano la somministrazione in vena.

MONOGRAFIA OCSE N°14: ASPETTI CRITICI, PUNTI DI DISCUSSIONE E FUTURE PROSPETTIVE

Cinelli S., Brunetti M.M., Mosiello A.
Research Toxicology Centre S.p.A., Pomezia, Roma

La monografia OECD No. 14 The application of The Principles of GLP to *in vitro* Studies è stata pubblicata nell'ambito della OECD Series of Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring il 30 Novembre 2004 con l'obiettivo di:

- promuovere la riduzione dell'utilizzo di animali nel processo di valutazione della sicurezza di nuovi prodotti;
- promuovere i test *in vitro* come alternativi o supplementare rispetto ai test *in vivo*;
- facilitare l'interpretazione e l'applicazione dei principi di GLP alla organizzazione e gestione dei test *in vitro*.

Vengono illustrate le modalità di adozione della monografia da parte di un Centro di Saggio, in merito a test *in vitro* e a metodi di analisi *ex vivo*, descrivendo alcuni esempi di interpretazione e applicazione. In questo ambito vengono messi in rilievo alcuni aspetti critici che necessitano di ulteriore discussione e approfondimento, quali a esempio la definizione di validità di un test, la raccolta dei dati storici, l'interpretazione statistica della variazione dei controlli storici in un laboratorio di ricerca e la conseguente valutazione della significatività biologica. La monografia è inoltre rivolta a nuove metodologie *in vitro* e/o *ex vivo* che dovrebbero diventare sempre più importanti e diffuse in relazione all'atteso sviluppo di nuovi settori di ricerca quali a esempio la tossicogenomica, la tossicoproteomica e la tossicometabonomica. In questo contesto emerge la necessità di definire dei criteri oggettivi per la validazione all'interno di un laboratorio di nuove metodiche anche in relazione allo stato d'avanzamento del loro sviluppo (i.e. disponibilità di una linea guida, di un metodo ufficialmente validato e/o di raccomandazioni scientifiche).

Terza Sessione Aula Marotta
Qualità dell'ambiente e protezione salute

Moderatori
S. Marchini, C. Zaghi

VALORI DI RIFERIMENTO PER GLI ELEMENTI IN TRACCIA IN UNA POPOLAZIONE URBANA

Bocca B.¹, Forte G.¹, Pino A.¹, D'Ippolito C.², Alimonti A.¹

¹*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ²*Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La conoscenza dei valori di riferimento (VR) per gli elementi in traccia nei fluidi biologici di gruppi di popolazione ben-definiti è uno strumento correttamente utilizzabile nella tossicologia ambientale e occupazionale per dare un significato a eventuali deviazioni. A idonei VR ci si riferisce per interpretare i risultati della sorveglianza biologica su individui a nota esposizione e per consentire una migliore comprensione dell'entità del rischio per la salute. La robustezza dei VR dipende dalla corretta caratterizzazione del gruppo di riferimento, dalle modalità di campionamento e di trattamento del campione e dalla determinazione finale. In questo studio, centoventi adulti sani abitanti nell'area urbana di Roma sono stati selezionati sulla base di rigidi criteri di idoneità ed esclusione. Sono stati individuati i VR per Al, Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb e V in siero e sangue. Lo schema sperimentale è stato improntato al massimo rispetto dell'informazione analitica. La spettrometria di massa ad alta risoluzione con sorgente a plasma ha evidenziato prestazioni adeguate alle concentrazioni riscontrate nella popolazione generale non professionalmente esposta. È anche riportato l'effetto di età, sesso, fumo e consumo di alcool sui livelli degli analiti considerati.

MEDIATORI DELL'INFIAMMAZIONE IN CELLULE RAW 264.7 INDOTTI DAL TRATTAMENTO CON PARTICOLATO ATMOSFERICO (PM)

Pozzi R.¹, Cassee F.R.³, Brunekreef B.⁴, Sandstrom T.⁵, Guastadisegni C.²

¹Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven; ⁴Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS), University of Utrecht; ⁵University Hospital, Umea

Nell'ambito del progetto europeo HEPMEAP (Health Effects of Particles from Motor Engine Exhaust and Ambient Air Pollution) il presente studio ha avuto l'obiettivo di valutare la tossicità *in vitro* del particolato atmosferico (PM), in relazione alla diversa composizione chimica. Il PM è una miscela e un aggregato di composti inorganici e organici tra cui è presente anche endotossina batterica. Questi componenti possono agire in maniera sinergica o additiva ed è pertanto estremamente difficile identificare la sostanza responsabile degli effetti tossici. I macrofagi alveolari sono le cellule che fagocitano il particolato atmosferico essendo deputate a difendere l'epitelio polmonare, nel processo di fagocitosi essi rilasciano mediatori della infiammazione quali l'Acido Arachidonico (AA) e l'Interleuchina-6 (IL6). È stata utilizzata una linea cellulare macrofagica: RAW 264.7. Abbiamo misurato il rilascio di AA e la produzione di IL6 dopo trattamento delle cellule con 41 campioni di fine (PM_{2,5-0,1}) e coarse (PM_{10-2,5}) raccolti in nove differenti siti europei. Le cellule RAW 264.7 sono state trattate con due concentrazioni di particelle 20 µg/cm² e 60 µg/cm² o con endotossina batterica o lipopolisaccaride (LPS) alla concentrazione di 1 µg/ml come controllo positivo della risposta infiammatoria. La vitalità cellulare è stata controllata tramite il rilascio di Lattico-Deidrogenasi (LDH) dopo 24hr di trattamento. Nessuno campione di PM, ad ambedue le concentrazioni, induceva una riduzione della vitalità cellulare, come evidenziato dai livelli di rilascio di LDH, sempre inferiore a quello indotto nel controllo positivo. Un maggior numero di campioni di coarse rispetto ai campioni fine, induceva un aumento del rilascio di AA nelle cellule RAW 264.7. In particolare, i campioni con un alto contenuto di metalli, raccolti vicino alla stazione di Monaco di Baviera, producevano un rilascio di AA più alto rispetto alle cellule trattate con LPS. L'analisi di tutti i campioni HEPMEAP ha evidenziato una correlazione significativa ($p < 0,0005$) di $r = 0,72$ tra il rilascio di AA e il contenuto di rame nei campioni coarse. I campioni di coarse erano inoltre più potenti dei campioni di fine nell'indurre la produzione di IL6, in relazione al più alto contenuto di endotossina. L'analisi di tutti i campioni HEPMEAP ha evidenziato una correlazione significativa ($p < 0,0005$) di $r = 0,6$ tra il contenuto di endotossina dei campioni coarse e la loro capacità di indurre una produzione di IL6 in cellule RAW 264.7. I risultati ottenuti in questo modello cellulare macrofagico suggeriscono che il PM 10-2,5 induce una risposta infiammatoria maggiore del PM 2,5-0,1, probabilmente associata alla presenza di metalli e di endotossina.

Questo studio è stato finanziato dal progetto europeo HEPMEAP (QLRT-1999-01582)

COLUMBA LIVIA COME SPECIE SENTINELLA DI EFFETTI TOSSICI DA INQUINAMENTO ATMOSFERICO URBANO

Prato N., Orsi F., Tringali M., Santagostino A.

Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi Bicocca, Milano

Lo studio riguarda lo sviluppo di *Columba livia* (Piccione) come bioindicatore di effetti nocivi sulla popolazione urbana conseguenti all'esposizione all'inquinamento atmosferico. I biomarker conservativi analizzati sono: il quadro porfirinico escreto, la metaemoglobinemia e i danni al DNA valutati sul sangue intero con il test della cometa. Abbiamo messo a punto una metodica atta a estrarre dal guano, conservare e analizzare, mediante separazione in HPLC, protoporfirina e uroporfirina da impiegare in una campagna di biomonitoraggio sui piccioni di varie piazze della città di Milano per determinare alterazione del quadro porfirinico, noto biomarker di esposizione a idrocarburi alogenati e a metalli, già impiegato nel campo della tossicologia occupazionale e usato anche da altri gruppi di lavoro in biomonitoraggi ambientali con alcune specie marine avicole e non. La campagna di biomonitoraggio durata un anno ha rilevato globalmente livelli significativamente più alti di porfirine escrete nei piccioni esposti all'aria di Milano rispetto ai controlli esposti ad aria non inquinata. Il quadro porfirinico rivela nei piccioni delle piazze di Milano un aumento percentuale di protoporfirina escreta, soprattutto nel periodo più freddo quando sono operanti gli impianti di riscaldamento domestici. Le analisi di regressione multifattoriale, condotte analizzando il quadro in relazione ai livelli degli inquinanti dell'aria (CO, NO₂, O₃, SO₂, C₆H₆ e PM₁₀) ha permesso di trovare un modello che dimostra una significativa, se pur debole, correlazione positiva soprattutto tra l'aumento percentuale della protoporfirina nel guano e i livelli di PM₁₀ nell'aria, fatto probabilmente attribuibile al contenuto in metalli e PHAH del particolato atmosferico. In considerazione che gli eritrociti negli uccelli sono nucleati, è stata messa a punto una metodica per condurre il test della cometa, atto a rilevare danni al DNA in maniera conservativa in *Columba livia*, su solo 100 microlitri di sangue intero, prelevato dalla vena alare. Le PCA e le analisi di regressione multifattoriali condotte sui dati di una campagna annuale mostrano un aumento significativo di danni al DNA nei piccioni esposti all'aria urbana soprattutto in alcuni campionamenti nei periodi con temperature relativamente elevate e in relazione ad alti livelli di O₃ e di NO₂. Anche un altro biomarker, il livello di metaemoglobinemia nel piccione, aumenta in relazione alla crescita dell'O₃ nell'aria urbana. I risultati dimostrano che *Columba livia* può essere un organismo sentinella per il monitoraggio del rischio in ambiente urbano soprattutto per analizzare i danni alla salute indotti da esposizione a smog ossidante.

MONITORAGGIO NUMERICO DEL MATERIALE PARTICOLATO NELL'ARIA DELLA CITTÀ DI TORINO IN PRESENZA/ASSENZA DI LIMITAZIONI AL TRAFFICO VEICOLARE

Casale F.¹, Nieddu G.², Burdino E.^{2,3}, Ugazio G.^{2,3}

¹Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università degli Studi di Torino; ²Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale, Sezione Patologia Ambientale, Università degli Studi di Torino; ³Gruppo di Ricerca per Prevenzione della Patologia Ambientale (GRIPPA), Torino

Introduzione L'inquinamento dell'aria da materiale particellare inalabile (particolato di dimensioni $<10 \mu\text{m}$ o PM_{10}) è stato messo in relazione al peggioramento delle condizioni respiratorie e il livello raggiunto da PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$ e $\text{PM}_{0,3}$ (particelle grossolane, medio-fini e ultrafini) negli agglomerati urbani ha comportato la necessità di limitare le fonti antropogeniche di emissione, in particolare quelle derivate dagli scarichi degli autoveicoli. La componente più tossica del particolato sarebbe legata al materiale più fine, in quanto la patogenicità non dipenderebbe dal peso totale del materiale inalato, quanto dal numero delle particelle penetrate in profondità e ritenute negli alveoli polmonari. Le condizioni ambientali, inoltre, possono influenzare pesantemente la circolazione e sedimentazione del PM. *Scopo del lavoro* - Nello studio in esame è stata condotta una ricerca sperimentale di monitoraggio delle diverse classi di PM nell'aria della città di Torino, privilegiando quelle ultrafini, a verifica dei possibili benefici derivati dalle restrizioni al traffico veicolare programmate nel corso di "domeniche ecologiche" nell'anno 2004. *Materiali e metodi* - La concentrazione delle particelle sospese è stata determinata, in 5 siti di prelievo, dal giovedì che precede fino al martedì successivo di 5 giornate "ecologiche" e 2 con circolazione veicolare normale. È stato calcolato il numero di particelle per unità di volume ($\text{N}^\circ/\text{litro}$) di 6 categorie con diametro $>0,3$, $>0,5$, $>0,7$, $>1,0$, $>3,0$ e $>5,0 \mu\text{m}$. Le condizioni climatiche sono state monitorate tramite centralina termometro-igrometro-barometrica, anemometro e pluviometro e sono state effettuate determinazioni di confronto in ambiente indoor domestico. *Risultati* - La composizione percentuale su base dimensionale è stata costante in tutti i dosaggi, con il 90% del PM presente inferiore a $0,5 \mu\text{m}$ (6% $0,5-0,7$, 2% $0,7-1,0$, 1% $1,0-3,0$, 0,5% $3,0-5,0$ e 0,2% $>5,0 \mu\text{m}$). Il numero totale di particelle/litro è invece risultato decisamente variabile nei diversi giorni e, in misura minore, siti di prelievo, con un incremento medio $>300\%$ rispetto al valore indoor. Concentrazioni di picco di $\text{PM}_{0,5}$ ($>500.000/\text{l}$) sono state riscontrate nel periodo invernale, anche in occasione delle giornate ecologiche. *Conclusioni* - I risultati dello studio dimostrano come, numericamente, le particelle ultrafini costituiscano la parte preponderante del particolato sospeso, confermando l'importanza di misurazioni per conteggio in luogo delle tradizionali basate sulla massa. L'attuazione di restrizioni al traffico veicolare non ha determinato alcun effetto riscontrabile sui livelli di PM totale, diversamente dalla presenza/assenza di vento e precipitazioni o l'utilizzo di impianti di riscaldamento nei mesi freddi.

Ricerca supportata da contributo della Regione Piemonte, Bando 2003

PROGETTO DATABASE ECOTOSSICOLOGICO NAZIONALE: PRIME ELABORAZIONI

Cerioli N.¹, Vagaggini D.², Cherubini E.¹

¹*Dipartimento Difesa della Natura, Settore Tossicologia e Indicatori Ambientali, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT), Roma;* ²*Servizio Interdipartimentale per le Emergenze Ambientali, Settore Studi e Valutazioni, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT), Roma*

I test ecotossicologici rappresentano un supporto indispensabile per tutte le valutazioni di carattere ambientale (monitoraggio, valutazione del danno ambientale, etc.). Le fonti a tutt'oggi disponibili sono rappresentate da database internazionali (es. ECOTOX), che considerano numerose sostanze e specie, le quali però non sono sempre presenti nel nostro paese. In tale situazione spesso il dato non è utilizzabile per le valutazioni su citate. Dall'esigenza di avere una raccolta di test organizzata e dati gestibili a livello nazionale nasce il progetto "Database ecotossicologico" proposto da APAT. La compilazione del database è attualmente in corso, i test inseriti, utilizzando ACCESS come supporto informatico, derivano dalla consultazione della letteratura scientifica di settore e sono quelli di maggior utilizzo nell'ecotossicologia (LC₅₀, EC₅₀, etc.); ovviamente sono inseriti in via prioritaria i test effettuati con procedure standardizzate (ISO, IRSA). Sono privilegiate, inoltre, quelle sostanze inquinanti per le quali esistono già dei limiti di concentrazione imposti dalla normativa nazionale (D.Lgs.152/99, DM 471/99, etc.). Le specie oggetto dei test (per ora solo animali) sono presenti sul territorio italiano, così come accertato dalla consultazione della check list nazionale e degli atlanti di distribuzione. Per ogni specie viene riportata la classificazione zoologica e segnalato l'habitat di appartenenza. In avvio di progetto sono state inserite specie caratteristiche di ambiente sotterraneo e di corsi d'acqua. Allo stato attuale il database contiene 935 record che si riferiscono a 33 specie, 124 sostanze e 16 tipi di test. Le elaborazioni hanno evidenziato che gli organismi più utilizzati provengono dalle acque superficiali; al contrario, per gli organismi tipici di acque sotterranee si rileva una notevole carenza di saggi imputabile all'ancora incompleta conoscenza tassonomica e all'estrema sensibilità di tali specie ai contaminanti, con la conseguente difficoltà di condurre analisi su di esse. La maggior parte dei test riguarda specie appartenenti al phylum Arthropoda, con particolare riferimento ai Crustacea. Un altro dato rilevante è la preponderanza di test sui metalli pesanti: questo rivela che la maggior parte degli studi è ancora rivolta alle sostanze che notoriamente in passato hanno prodotto contaminazione ambientale; poco studiate sono invece le sostanze di più recente sintesi e diffusione (ormoni, antibiotici). L'ulteriore ampliamento del database per questi e per altri ambienti, così come previsto dal progetto, potrà offrire un panorama più dettagliato della situazione rendendo il database uno strumento operativo e facilmente utilizzabile da tutti coloro che lavorano in campo ambientale.

Sessione Plenaria Aula Pocchiari
La sicurezza dei prodotti farmaceutici:
innovazioni e nuove sfide

Moderatori
M. Massotti, S. Raimondo

TERAPIE INNOVATIVE: ESISTONO NUOVI MODELLI SPERIMENTALI ADEGUATI?

Fais S.

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

È sempre viva l'esigenza di modelli *in vivo* più adeguati alla necessità di verificare pre-clinicamente la efficacia e la tossicità di nuovi farmaci. I primati non umani sono ancora considerati il modello animale più vicino all'uomo per verificare in particolare il livello di tossicità. Fatti recenti hanno chiaramente confermato questo punto di vista per quanto riguarda i nuovi approcci di terapia genica. Le reazioni avverse, spesso mortali, che si sono verificate in alcuni studi clinici, nei quali sono stati usati vettori adenovirali, sono state riprodotte solo nelle scimmie, tanto che il modello murino è stato definitamene considerato non adeguato come test pre-clinico di nuovi approcci di terapia genica. La finestra rimane del tutto aperta per gli studi di efficacia. A questo riguardo i modelli tuttora in studio, sono quello xenochimerico (topo/uomo) e i topi o ratti transgenici ovvero knockout per la proteina in esame. In questo caso si prenderà in esame l'adeguatezza dei modelli xenochimerici uomo/topo. Tali modelli sono per lo più costituiti da mutanti immunodeficienti di alcuni ceppi di topo, in grado quindi di accogliere xenotraspianti umani. I topi più usati sono i topi CB.17 SCID/SCID (Severe Combined Immunodeficiency) derivanti dal ceppo CB.17, nei quali dalla nascita non vengono prodotti linfociti sia B che T. Da questi topi sono stati selezionati ceppi ancora più immunodeficienti quali gli SCID/beige e i NOD/SCID, che mancano anche di cellule natural killer (NK). La necessità di ottenere topi con un grado molto grave di immunodeficienza stabile nel tempo è venuta fuori nei tentativi che sono stati fatti di ricostituire i topi SCID con linfociti o cellule di midollo umani. In generale questi topi sono in grado di sviluppare una reazione immune non specifica che può rapidamente eliminare le cellule umane. Risultati importanti si sono ottenuti con modelli costituiti da topi SCID inoculati intraperitoneo con linfociti del sangue periferico umano. I linfociti umani sono per esempio infettabili *in vivo* con vari ceppi di HIV-1 e in questo modello sono state testati alcuni approcci di terapia innovativa anti-HIV, quali cellule dendritiche stimulate con antigeni di HIV e citochine. Ma, l'uso più proficuo dei modelli topi SCID/uomo è stato nelle terapie anti-tumorali. Risultati interessanti si sono ottenuti sia con approcci di immunoterapia sia con farmaci anti-tumorali. I modelli in questo caso sono costituiti dai topi SCID inoculati sottocute od intraperitoneo con cellule tumorali umane che crescono nel topo sottoforma di tumore solido. Nelle nostre mani in questi modelli si è potuto per esempio stabilire che linfociti citotossici antigene-specifici possono avere una efficacia iniziale nel controllare la crescita tumorale, ma selezionando con il tempo tumori molto aggressivi che in massima parte non esprimono tali antigeni. Inoltre, ci hanno mostrato che l'efficacia *in vitro* di cellule natural killer può essere inutile se le cellule killer non arrivano al tumore, mentre cellule *in vitro* meno efficaci possono mostrare un maggior effetto anti-tumorale in quanto capaci di arrivare al tumore. Nel caso dei farmaci antitumorali in questi modelli è stato possibile anche dimostrare l'importanza della acidità presente nell'ambiente tumorale nella farmacoresistenza.

EPATOTOSSICITÀ: NUOVI APPROCCI PER UNA VALUTAZIONE PRECOCE DEL DANNO

Meneguz A.

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nell'ultimo decennio numerosi farmaci sono stati ritirati dal mercato sia in USA che in Europa principalmente a causa di seri effetti avversi dovuti a tossicità epatica. Attualmente non sono disponibili a livello nazionale e nemmeno europeo, linee guida specifiche su come analizzare effetti tossici epatici in maniera prospettica durante il programma di sviluppo di un prodotto medicinale. Verrà illustrata la linea guida attualmente in discussione al Safety Working Group, [gruppo tecnico dell'agenzia europea dei farmaci (EMA), che si occupa di aspetti di sicurezza non clinica], che introduce un approccio a passi successivi (Step I – III, *step by step approach*) per la determinazione e la conduzione di studi volti a migliorare la valutazione della rilevanza dei segnali di epatotossicità in ambito non clinico. La raccolta dei segnali clinici indicatori di danni epatici precoci, non può essere ristretta a una fase specifica del programma di sviluppo di un farmaco, ma è piuttosto un processo continuo che copre tutte le fasi, nel quale una grande enfasi è data all'ottimizzazione dei risultati ottenuti negli studi pilota standard non clinici. Inoltre viene proposta la conduzione di studi orientati alla valutazione del meccanismo d'azione, tenendo in considerazione i risultati della cosiddetta "batteria standard di test tossicologici". I principi che la linea guida suggerisce si applicano anche all'indagine su segnali di tossicità epatica derivati da segnalazioni della farmacovigilanza post registrazione. Tutti i segnali indicativi di epatotossicità debbono essere raccolti in un paragrafo dedicato del dossier di registrazione. L'obiettivo principale della linea guida è fornire un aggiornamento su come identificare, raccogliere e relazionare segnali precoci di danno epatico, allo scopo di ridurre il rischio di reazioni avverse a carico del fegato durante l'uso clinico esteso. I principi che vi sono descritti possono essere anche applicati in casi di prodotti già sul mercato per i quali si siano manifestate reazioni avverse.

MEDICINALI PER USO PEDIATRICO: RILEVANZA DELL'IMPIEGO DI ANIMALI GIOVANI NEGLI STUDI NON CLINICI

Braghiroli L.¹, Leone M.G.¹, Meneguz A.²

¹*Agenzia Italiana del Farmaco, Roma;* ²*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La maggior parte dei farmaci usati in pediatria non è stata sviluppata per l'impiego clinico in questa specifica fascia d'età. L'estrapolazione dei dati dall'adulto al bambino spesso non è appropriata a causa delle marcate differenze in termini di farmacocinetica e farmacodinamica. Numerosi sono i fattori che rendono difficoltosa la conduzione di studi clinici in pediatria: problemi di ordine etico (esclusione della popolazione infantile dagli studi di fase I, difficoltà nell'ottenere il consenso, presenza nei CE di esperti, ecc.), di ordine metodologico (scarsa numerosità del campione, difficoltà a ottenere sangue e materiale biologico in quantità adeguate, ecc.) e di ordine economico (scarso interesse a investire nello sviluppo di farmaci che difficilmente avranno un ritorno economico), con conseguente creazione di un mercato farmaceutico orfano. Questo quadro comporta la carenza di medicinali specifici per bambini e il conseguente impiego off-label dei prodotti autorizzati per l'adulto. L'uso off-label in Europa è stato stimato pari a circa il 60% di tutte le prescrizioni pediatriche. Tale uso è associato a un aumento di rischi di reazioni avverse anche gravi e di una frequenza di errore terapeutico che in pediatria è risultato essere 12 volte maggiore che per l'adulto. In questo contesto assume particolare importanza la linea guida in corso di emanazione da parte dell'EMA (CHMP/SWP/169215/2005) sulla necessità della conduzione di studi non clinici in animali giovani. Scopo principale della linea guida è quello di evidenziare i potenziali effetti del trattamento, non emersi durante i precedenti studi non clinici e clinici, sulla crescita e sullo sviluppo, o a valutare eventuali effetti tossici locali o sistemici nell'animale giovane, già evidenziati nell'animale adulto. Un'altro obiettivo è quello di approfondire la tossicità d'organo osservata nell'animale adulto, soprattutto in relazione a quegli organi, quali a esempio sistema nervoso centrale, soggetti a un significativo sviluppo post-natale. L'impiego di questi studi potrà costituire quel valore aggiunto al fine di acquisire maggiori informazioni in casi particolari in cui i dati ottenuti dagli studi non clinici e clinici e dalla valutazione post-marketing non siano sufficienti a stabilire un rapporto rischio-beneficio. Saranno presentati alcuni esempi e punti critici che prendono in considerazione anche gli aspetti di predittività di tali studi per i pazienti pediatrici.

BIOTECNOLOGIE IMMUNOLOGICHE E LORO APPLICAZIONI

Cianfriglia M., Flego M., Ascione A.

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La costruzione di anticorpi monoclonali di predeterminata specificità mediante tecniche di DNA ricombinante è di per se un risultato straordinario, ma non di meno lo sono altri aspetti di questa tecnologia. Infatti se passiamo brevemente in rassegna alcune caratteristiche che contraddistinguono gli anticorpi fagici come: a) i tempi di realizzazione estremamente brevi per il loro isolamento (generalmente due-tre settimane), b) le alte rese di produzione con costi notevolmente ridotti dovuti all'utilizzo di batteri in luogo di cellule somatiche per l'espressione e la secrezione degli anticorpi, c) la buona affinità di legame per l'antigene che può essere considerevolmente aumentata attraverso processi di mutagenizzazione a carico del DNA codificante per gli scFv, emerge in modo evidente che ci troviamo di fronte a un nuovo tipo e a un nuovo modo di produrre anticorpi. Questo straordinario successo della ingegneria genetica è stato raggiunto con il contributo di diversi studiosi ma senza dubbio molto si deve al lavoro pionieristico di Winter, Hogenboom e Barbas III, i quali dimostrarono che era possibile esprimere su fagi filamentosi frammenti immunoglobulinici derivati dal clonaggio di geni VH e VL di linfociti immuni (librerie anticorpali immuni) o da cellule del sistema eritro-linfopoietico (librerie anticorpali *naive*). L'estrema flessibilità del sistema fagico, che permette di introdurre mediante mutagenesi su templati di DNA codificanti per VH e VL una serie di cambiamenti nei residui aminoacidici delle regioni ipervariabili (CDR1, CDR2 e CDR3), rende possibile la costruzione di librerie anticorpali sintetiche caratterizzate da un numero di variabilità anticorpali estremamente elevato. Gli scFv espressi su fagi sono costituiti da una singola catena polipeptidica che include il dominio variabile della catena pesante dell'immunoglobulina (VH) legato mediante un polipeptide flessibile (*linker*) a un dominio variabile della catena leggera (VL). In questo modo le specificità anticorpali risultano saldate insieme originando una molecola strutturalmente e funzionalmente immunocompetente. Usualmente nel costrutto viene inserito un sequenza bersaglio (*Tag*) per rendere la reazione anticorpale rilevabile con anticorpi secondari. I frammenti immunoglobulinici di predeterminata specificità ottenuti per via ricombinante riducono enormemente i problemi di sicurezza associati all'utilizzo clinico di anticorpi monoclonali prodotti mediante la tecnologia degli ibridomi. Infatti, la derivazione umana degli scFv riduce i rischi di reazioni immuni avverse, mentre le ridotte dimensioni della molecola anticorpale consentono una rapida *clearance* ematica e tissutale e una scarsa captazione epatica o di altri organi. Nella presentazione illustreremo come il sistema fagico è stato utilizzato per l'isolamento di scFv diretti verso antigeni di interesse biomedico e come questo nuovo tipo di anticorpi può essere utilizzato per la diagnosi e terapia di malattie infettive e neoplastiche.

ATTIVITÀ INVESTIGATIVE A SUPPORTO DEGLI STUDI REGOLATORI NELLO SVILUPPO TOSSICOLOGICO DEL FARMACO

Dal Negro G.
GSK Research Center, Verona

I problemi legati alla tossicità dei farmaci rappresentano la principale causa di “caduta” di un potenziale candidato nella fase di sviluppo pre-clinico, di un farmaco in fase di sviluppo clinico e a volte nella fase post-marketing. Per questo motivo, nell’ultimo decennio si è verificato un crescente interesse e sponsorizzazione, da parte delle autorità regolatorie nazionali e internazionali, di un’analisi sempre più approfondita del potenziale tossico di nuove molecole finalizzata all’eliminazione della tossicità da farmaci nel paziente. E’ oggi chiaro che la tossicologia tradizionale non può da sola essere la soluzione del problema. Le nuove tecnologie (modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro*, metodi analitici e di indagine molto specifici e predittivi, biologia molecolare, transgenica) sono strumenti che vanno sempre più consolidandosi ed entrando nella pratica quotidiana della ricerca pre-clinica e clinica. Oltre alle tecnologie, sta sempre più maturando una nuova mentalità nell’approcciare la valutazione della sicurezza dei farmaci. Questa mentalità, applicabile peraltro anche ad altre discipline, prevede una visione a più ampio spettro dell’oggetto di indagine: in altre parole, non più ricerca settoriale per disciplina, ma interazione multidisciplinare, grazie alla quale il tossicologo, il farmacologo e il clinico interagiscono per costruire un piano di sviluppo in cui i potenziali ostacoli vengono quanto più possibile previsti e i potenziali scenari valutati così come le possibili azioni correttive. In questa presentazione verrà trattato questo approccio a 360 gradi, portando degli esempi, per rendere quanto più chiaro possibile il concetto nella sua accezione più ampia.

Quarta Sessione Aula Pocchiari
Pesticidi: dalla ricerca al controllo

Moderatori
P. Cavallaro, E. Testai

EFFETTI IMMUNOMODULATORI DELL'ERBICIDA PROPANIL SUL RILASCIO DI CITOCHINE: STUDI *IN VIVO* E *IN VITRO*

Corsini E.¹, Birindelli S.², Marinovich M.¹, Galli C.L.¹, Minoia C.³, Colosio C.²

¹Laboratorio di Tossicologia, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano; ²ICPS, Ospedale L. Sacco, Milano; ³Fondazione S. Maugeri, IRCCS, Pavia

Evidenze sperimentali nel topo hanno dimostrato la capacità dell'erbicida propanil (3,4-dicloropropionanilide) di indurre alterazioni a carico del sistema immunitario. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare eventuali effetti immunotossici del propanil in lavoratori agricoli professionalmente esposti. Uno studio pilota è stato pertanto condotto in Lombardia su lavoratori agricoli coinvolti nella coltivazione del riso, la quale prevede l'utilizzo di questo pesticida. Allo studio hanno aderito sette lavoratori e sette individui controllo, tutti di sesso maschile. Sono stati presi in considerazione diversi parametri ematici e di funzionalità immunitaria, mentre l'esposizione è stata determinata tramite la misurazione dell'escrezione urinaria di 3,4-dicloroanilina, il principale metabolita del propanil. Questo studio ha evidenziato che l'esposizione intermittente a propanil, tipica del lavoratore agricolo, induce un lieve aumento nella conta leucocitaria totale, nella percentuale delle cellule CD4+ e nel numero assoluto dei linfociti B. Tuttavia, nonostante questo aumento nella cellularità, la capacità dei linfociti di produrre citochine in risposta a stimoli mitogeni risulta compromessa. In particolare, si è osservata una significativa riduzione nella produzione di interferone-gamma e interleuchina-10, consistente con i dati ottenuti nell'animale da laboratorio. Mentre la produzione di citochine pro-infiammatorie (es. IL-1beta, IL-6 e TNF-alpha) non è risultata alterata. In parallelo, sono stati condotti studi *in vitro* su sangue periferico ottenuto da volontari sani. *In vitro*, come *in vivo*, il trattamento con propanil riduce la produzione di interferone-gamma e IL-10 a seguito a stimolazione con fitoemoagglutinina, mentre la produzione di citochine proinfiammatorie indotta da lipopolissaccaride non è risultata modulata, suggerendo un effetto diretto del propanil sulle cellule immunitarie. In assenza di studi epidemiologici o di evidenze cliniche di patologie correlabili ad alterazioni immunitarie, il significato fisiologico di queste alterazioni è tuttora incerto in attesa di ulteriori studi.

L'ESPOSIZIONE PRE- E POST-NATALE AL CLORPIRIFOS INDUCE ALTERAZIONI A LUNGO TERMINE NELLA REATTIVITÀ LOCOMOTORIA E NELLE RISPOSTE A STIMOLI SOCIALI IN TOPI CD1

Ricceri L., Venerosi A., Capone F., Alleva E., Calamandrei G.

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Studi condotti in modelli animali sull'esposizione al pesticida organofosfato clorpirifos (CPF) hanno dimostrato che dosi di CPF sub-tossiche esercitano effetti nocivi sullo sviluppo del sistema nervoso. Tali studi dimostrano che esiste un'ampia finestra di vulnerabilità del cervello in sviluppo al CPF, dal periodo prenatale al postnatale. Nei roditori, l'esposizione a dosi sub-tossiche di CPF durante la fase neonatale produce un ritardo nell'acquisizione di riflessi sensorimotori, iperattività locomotoria, alterazioni del comportamento sociale durante l'adolescenza e, nel ratto, anche deficit cognitivi. Topi CD-1 sono stati esposti a CPF prenatalmente (giorni di gestazione 15-18, dosi 3 o 6 mg/kg) e nel periodo postnatale (giorni postnatali 11-14, dosi 1 o 3 mg/kg). All'età di tre mesi i topi maschi sono stati sottoposti a un test di open-field della durata di 20 min seguito da un test di incontro sociale agonistico con un conspecifico. Le femmine alla stessa età sono state invece sottoposte a un test di induzione materna (stimolata nelle femmine vergini dall'esposizione a piccoli di topo dello stesso ceppo) e successivamente a un test di riconoscimento sociale (incontro con un'altra femmina familiare o non familiare) con misurazione delle risposte comportamentali e delle vocalizzazioni ultrasoniche (USV) emesse dalla femmina residente. I risultati dell'open-field mostrano che sia l'esposizione prenatale che postnatale al CPF determina un incremento dell'attività locomotoria, un effetto significativo dopo trattamento con la dose prenatale 6 mg/kg o dopo esposizione combinata prenatale 6 con le due dosi postnatali 1 e 3 mg/kg. Nel test sociale agonistico si evidenzia un effetto pro-aggressivo del trattamento CPF, sia prenatale che postnatale. In particolare la dose prenatale 6 mg/kg induce un aumento del numero di posture offensive, mentre la dose postnatale 3 mg/kg in un aumento del numero e della durata degli attacchi. Nel test di induzione materna invece gli effetti pre-e postnatali del CPF si differenziano: il trattamento CPF prenatale determina un aumento dello sniffing, una risposta aspecifica di interazione con il piccolo, mentre il trattamento CPF postnatale (3 mg/kg) induce un aumento nella frequenza e durata di risposte comportamentali (crouching e licking del piccolo) che sono parte integrante del repertorio materno. Nel test di riconoscimento sociale di una femmina conspecifica non si osservano effetti dell'esposizione a CPF pre o postnatale nelle risposte di "riconoscimento individuale", mentre nel gruppo esposto prenatalmente alla dose 6 mg/kg si evidenzia un significativo aumento nell'emissione di USV da parte della femmina residente. Nel complesso tali risultati, in accordo con dati precedenti raccolti dopo la sola esposizione postnatale a CPF, indicano un ampio spettro di alterazioni comportamentali, che includono iperattività e aumentata reattività a stimoli sociali di diversa natura. Tali alterazioni potrebbero essere attribuite all'interferenza del CPF con lo sviluppo di sistemi neurochimici implicati nella modulazione delle risposte sociali (p.e serotonina) ma anche agli effetti del pesticida sugli ormoni tiroidei in periodi critici nell'ontogenesi del sistema nervoso centrale.

LA BIOATTIVAZIONE DEL FENTHION CATALIZZATA DA CYP E FMO UMANI RICOMBINANTI

Leoni C., Buratti F.M., Testai E.

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il fenthion è un pesticida organofosforotionato (OPT), utilizzato in Italia principalmente per la protezione di uliveti e frutteti, caratterizzato dalla presenza di due atomi di zolfo sulfossidabili. Oltre all'oxon, il tipico metabolita tossico degli OPT, il fenthion può essere bioattivato nel ratto dal citocromo P450 e dalle FMO anche al corrispondente sulfossido, che per successiva ossidazione, può generare sulfone: tutti e tre i metaboliti sono in grado di inibire la AChE, bersaglio della neurotossicità degli OPT, anche se con potenza diversa (IC50 di oxon, sulfossido e sulfone: 3,1µM; 69,4µM e 9,4µM, rispettivamente). Mediante l'uso di enzimi umani ricombinanti sono stati identificati i CYP e le FMO umani in grado di formare i metaboliti del fenthion e si sono calcolate le costanti cinetiche (V_{max} , K_m e CL_i) e il contributo relativo alla bioattivazione totale del pesticida a concentrazioni rappresentative delle reali condizioni di esposizione umana (0,5-100 µM).

I CYP 1A2, 2C9 e 3A4, formano sia oxon che sulfossido in quantità paragonabili sebbene con CL_i molto diverse (1A2 >> 2C9 ≈ 3A4); il CYP1A1 catalizza unicamente la formazione di sulfossido; il CYP2B6 forma principalmente oxon, mentre il 2C19 mostra al contrario preferenza per la formazione del sulfossido. Le altre isoforme non si sono mostrate attive nel bioattivare il fenthion. Inoltre nelle condizioni sperimentali utilizzate non è mai stato osservata la formazione di sulfone. Tra le FMO la isoforma principalmente espressa in tessuti extraepatici (FMO1) si è dimostrata più attiva nel formare sulfossido rispetto alla FMO3, localizzata essenzialmente nel fegato; le FMO comunque sono risultati meno efficienti rispetto ai CYP e rappresentano un percentuale limitata della capacità metabolica totale (≈10%). Considerando il contenuto medio di CYP nel fegato e i valori di CL_i a basse concentrazioni di pesticida (assimilabili a quelle di esposizione reale), il contributo maggiore (80- 90%) alla bioattivazione del fenthion è a carico del CYP1A2, mentre a concentrazioni più elevate, rappresentative di avvelenamenti e intossicazioni acute, anche l'attività del CYP3A4 assume un ruolo significativo. Questi dati confermano quanto osservato con altri pesticidi OPT (diazinon, chlorpyrifos, azynphos-methyl, parathion, malathion e dimethoate) caratterizzati da sostituenti sia lineari che aromatici. Può quindi essere ipotizzato che indipendentemente dalla struttura del singolo OPT inclusa la presenza di altri atomi di zolfo sulfossidabili, nelle condizioni di esposizione reale, il CYP1A2 può essere considerato un buon candidato come possibile biomarcatore di suscettibilità agli effetti tossici indotti da OPT.

Il lavoro è stato parzialmente finanziato dal progetto ISS Fasc.3AAS.

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE DELLA POPOLAZIONE ITALIANA AI FITOFARMACI ATTRAVERSO IL CONSUMO DI ACQUA DESTINATA AL CONSUMO UMANO

Fava L.¹, Alonzo E.², Finocchiaro S.³, Strumia C.⁴, Rossino V.⁵, Martinelli A.⁶, Bartoli D.⁷, Ferronato A.⁸, Sartori G.⁹, Broglia L.¹⁰, Calà P.G.¹¹, Franchi A.¹², Fardella M.¹, Scardala S.¹, Orrù M.A.¹, Funari E.¹

¹Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Servizio Igiene Alimenti e Nutrizione, AUSL 3, Regione Siciliana, Catania; ³Agenzia Regionale Protezione dell'Ambiente della Sicilia, Catania; ⁴Settore Igiene e Sanità Pubblica Regione Piemonte, Torino; ⁵Agenzia Regionale Protezione dell'Ambiente del Piemonte, Vercelli; ⁶Agenzia Regionale Protezione dell'Ambiente dell'Umbria, Perugia; ⁷Agenzia Regionale Protezione dell'Ambiente dell'Umbria, Perugia; ⁸Agenzia Regionale Protezione dell'Ambiente del Veneto, Padova; ⁹Agenzia Regionale Protezione dell'Ambiente del Veneto, Dipartimento di Vicenza; ¹⁰Agenzia Regionale Protezione dell'Ambiente della Lombardia, Dipartimento di Pavia; ¹¹Settore Igiene Pubblica, Regione Toscana, Firenze; ¹²Agenzia Regionale Protezione dell'Ambiente della Toscana, Dipartimento di Firenze

Nell'ambito di un Progetto triennale riguardante la valutazione dell'esposizione della popolazione ai fitofarmaci attraverso il consumo delle acque e del relativo rischio associato, (Art. 17 del D.L.vo 194/95), è stato definito l'approccio che segue. È stata innanzi tutto elaborata una lista di prodotti fitosanitari prioritari sulla base dell'esame dei dati di mobilità e persistenza (rappresentati dai parametri Koc e DT50), di vendita e di monitoraggio (dati italiani, di altri paesi, letteratura scientifica) riguardanti i circa 500 fitofarmaci autorizzati al commercio in Italia. Da questa prima attività sono stati selezionati circa 50 fitofarmaci (inclusi alcuni loro metaboliti), ritenuti probabili contaminanti delle acque. Questi composti sono stati ricercati in campioni di acque sotterranee utilizzate per uso potabile prelevati in 20 siti di cinque Regioni italiane, rappresentativi di aree agricole a diversa coltura e con una non trascurabile vulnerabilità alla contaminazione chimica (sulla base di dati storici o dei livelli di nitrati). I campioni di acqua sono stati analizzati da sette laboratori diversi (appartenenti a sei Regioni oltre al laboratorio dell'ISS). Ogni laboratorio ha analizzato un numero limitato dei pesticidi selezionati, che rientravano tra quelli analizzati routinariamente. I risultati ottenuti mostrano che dei fitofarmaci esaminati soltanto poco più di dieci (parentali e metaboliti) sono contaminanti delle acque analizzate. In diversi campioni d'acqua sono stati ritrovati più fitofarmaci contemporaneamente. I livelli sono risultati sempre inferiori alle linee guida dell'OMS, quando è stato possibile il confronto. In rari casi sono state superate le CMA.

ASPETTI APPLICATIVI DELLA DIRETTIVA “PREPARATI PERICOLOSI” : LE RICADUTE SUI PREPARATI FITOSANITARI SEGUITO DEL PROCESSO DI RICLASSIFICAZIONE

Rubbiani M., Fornarelli L., Bascherini S., Binetti R.

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,
Roma*

Con il decreto legislativo 14 marzo 2003, n. 65 (decreto legislativo n. 65/2003, supplemento ordinario n. 61/L alla Gazzetta Ufficiale n. 87 del 14 aprile 2003) viene data attuazione alla direttiva n. 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 maggio 1999 e alla direttiva 2001/60/CE della Commissione del 7 agosto 2001 concernente il riavvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, imballaggio ed etichettatura dei preparati pericolosi. La direttiva 1999/45/CE apporta una serie di modifiche rappresentando la nuova normativa quadro in materia di classificazione, imballaggio ed etichettatura dei preparati pericolosi. Il decreto in oggetto fornisce i criteri per la valutazione di pericolosità dei preparati, indipendentemente dalla loro destinazione d'uso, e completa l'azione intrapresa, in stretto collegamento con le analoghe direttive dell'U.E., per regolamentare la complessa problematica della classificazione, imballaggio ed etichettatura dei preparati pericolosi. Le ricadute applicative della direttiva 99/45 derivano direttamente dalle novità di rilievo introdotte. Tra queste, viene introdotta per la prima volta, anche per i preparati, la categoria di pericoloso per l'ambiente; Inoltre, sempre per la prima volta, il campo di azione della direttiva viene esteso ai preparati fitosanitari e ai biocidi. Nella presentazione vengono indicate, attraverso una panoramica sulle riclassificazioni effettuate per i prodotti fitosanitari alla luce della nuova norma, le risultanze in termini di variazioni delle etichette (confronto tra vecchia e nuova classificazione e tra classificazione proposta dal produttore e classificazione effettiva). Vengono inoltre presentate le più significative problematiche di rilievo incontrate durante la procedura di riclassificazione e i criteri utilizzati per la loro soluzione.

SORVEGLIANZA DELLE INTOSSICAZIONI ACUTE DA ANTIPARASSITARI: OSSERVAZIONI EFFETTUATE NEL 2004

Settimi L.¹, Davanzo F.², Marcello I.¹, Russo A.³, Locatelli C.⁴, Cilento I.⁵, Farina M.L.⁶
Faraoni L.², Maiozzi P.¹, Crobe A.¹, Carbone P.¹

¹Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Centro Antiveleni di Milano, A.O. Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano; ³Centro Antiveleni, Università degli Studi La Sapienza, Roma; ⁴Servizio di Tossicologia, Centro Antiveleni e Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, IRCCS, Fondazione Maugeri, Università degli Studi di Pavia; ⁵Centro Antiveleni, Ospedale A. Cardarelli, Napoli; ⁶Centro Antiveleni Ospedali Riuniti, Bergamo

Introduzione. L'entità dei consumi di antiparassitari agricoli colloca l'Italia al terzo posto in Europa e al sesto a livello mondiale (Agrofarma. Mercato italiano di agrofarmaci-Dati di quantità-<http://agrofarma.federchimica.it>), mentre non risultano noti i quantitativi utilizzati in ambito domestico e civile. In considerazione della diffusione di questi agenti sul territorio nazionale e della loro potenziale pericolosità per l'uomo, presso l'Istituto Superiore di Sanità è stato avviato un piano di sorveglianza delle intossicazioni acute, basato sul contributo dei Centri Antiveleni (CAV) (G.U. n. 121, del 27.05.2003).

Materiali e metodi. A partire dal 1 gennaio 2004 hanno collaborato alla sorveglianza i CAV di Milano, Roma Università "La Sapienza", Pavia, Napoli e Bergamo. Le segnalazioni inviate da questi centri con procedura standard sono state classificate in termini di verosimiglianza dell'intossicazione e a ogni agente riportato è stata attribuita la tipologia di uso, la categoria di impiego e la classe chimica.

Risultati. Nel corso del 2004 i CAV collaboranti hanno inviato 2.715 segnalazioni riferite ad antiparassitari. Di queste, 1267 riferite ad agenti agricoli e 1418 ad agenti di uso domestico e civile. Relativamente agli agenti agricoli, i casi di intossicazione confermata sono stati 478, di cui 389 di tipo accidentale. La maggior parte di questi casi è risultata di sesso maschile (80%) e di età superiore a 15 anni (94%). L'esposizione è stata di tipo occupazionale per il 50% dei casi. Le categorie di agenti più frequentemente riportate sono state gli insetticidi (54% delle esposizioni), in particolare esteri organofosforici (22% delle esposizioni), e fungicidi (26% delle esposizioni). I composti cui è stato associato il numero più elevato di casi sono stati metomil (n=54), composti del rame (n=47), glifosate (n=34) e dimetoato (n=30). L'andamento mensile delle intossicazioni ha mostrato che circa il 64% degli incidenti si è verificato tra maggio e settembre. I casi di intossicazione da antiparassitari di uso domestico e civile sono risultati 194, di cui 154 di tipo accidentale con un'uguale proporzione di uomini e donne e circa il 32% riferito a soggetti di età inferiore a 15 anni. Le esposizioni si sono verificate per l'85% dei casi in ambiente domestico. Le categorie di agenti più frequentemente riportate sono state gli insetticidi (79% delle esposizioni) e i repellenti (16% delle esposizioni). I composti cui è stato attribuito il numero più elevato di casi sono stati propoxur (n=24), dietiltuolammide (n=21), e piperonil butossido (n=18). Circa il 69% degli incidenti si è verificato tra giugno e settembre.

Commenti. Il contributo dei CAV al sistema di sorveglianza promosso dall'Istituto Superiore di Sanità ha permesso di caratterizzare il fenomeno delle intossicazioni acute da antiparassitari nella sua complessità. Le osservazioni effettuate costituiscono una prima base informativa per orientare approfondimenti e iniziative per la prevenzione.

Quarta Sessione Aula Marotta
Stress ossidativo

Moderatori
W. Malorni, F. Rossi

RUOLO DELLE ERK1/2 NEL MECCANISMO DI SOPRAVVIVENZA MEDIATO DALL'ACIDO ARACHIDONICO IN CELLULE U937 ESPOSTE AL PEROSSINITRITO

Cerioni L., Cantoni O.

Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino

In diversi tipi cellulari appartenenti al lineaggio monocitico/macrofagico, concentrazioni sub-tossiche di perossinitrito inducono effetti mitocondriali potenzialmente in grado di evocare transizione della permeabilità della membrana mitocondriale interna (MPT) e una successiva, rapida morte di tipo necrotico. Tali eventi vengono tuttavia prevenuti dal parallelo innesco di un signalling citoprotettivo mediato dall'attivazione della fosfolipasi A₂ citosolica (cPLA₂). L'acido arachidonico (AA) che viene così liberato permette l'attivazione della 5-lipossigenasi (5-LO) e il conseguente rilascio di metaboliti (in particolare l'acido 5-idrossieicosatetraenoico), responsabili della traslocazione mitocondriale della proteina chinasi C α (PKC α). In queste condizioni, la PKC α promuove la traslocazione di Bad dal mitocondrio al citosol, prevenendo così l'eterodimerizzazione dello stesso con Bcl-2. Pertanto, questa cascata di eventi crea condizioni ottimali per l'attività anti-MPT di Bcl-2 e impedisce che il danno mitocondriale mediato dal perossinitrito sia seguito dalla necrosi MPT-dipendente. Questi effetti si riscontrano prontamente a seguito dell'interruzione del signalling a livello di cPLA₂, 5-LO e PKC α , così come in cellule depletate geneticamente in Bcl-2. È interessante notare che concentrazioni intrinsecamente tossiche di perossinitrito mediano l'evento letale attraverso l'inibizione del signalling citoprotettivo, che prende luogo a seguito della formazione mitocondriale di superossidi e, quindi, di H₂O₂. Questo studio dimostra che l'H₂O₂ così formato è responsabile dell'inibizione delle chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK1/2) osservata in cellule U937 esposte al perossinitrito. Tale effetto è mediato dall'attivazione di tirosine fosfatasi e si associa all'inibizione della liberazione di AA, dal momento che le ERK1/2 fosforilano, attivandola, la cPLA₂. Analogamente, è stato rilevato che anche l'attività della 5-LO era regolata dalla fosforilazione mediata dalle ERK1/2. Quindi, nelle condizioni in cui il signalling previene la localizzazione mitocondriale di Bad, l'H₂O₂ viene prodotta in quantità insufficienti per ridurre la disponibilità di AA e per inibire l'attività di 5-LO. Questi eventi, tuttavia, si osservano prontamente quando la produzione di H₂O₂ viene incrementata attraverso l'utilizzo di inibitori *bona fide* del complesso III, oppure a seguito dell'inibizione farmacologica delle ERK1/2, e sono rapidamente seguiti dalla traslocazione mitocondriale di Bad e Bax e da una rapida necrosi MPT-dipendente. In conclusione, i risultati riportati in questo studio indicano che le ERK1/2 giocano un ruolo critico nel signalling protettivo evocato dal perossinitrito. In particolare, le ERK1/2 controllano l'attività di due punti nodali del suddetto signalling collocati a monte di Bad. La morte cellulare MPT- dipendente si osserva solamente quando l'attività delle ERK1/2 viene inibita dall'eccessiva formazione mitocondriale di H₂O₂.

LE CATECHINE, SCAVENGER NATURALI DI RADICALI LIBERI, COME PREVENZIONE DEI DANNI INDOTTI DALL'OCRATOSSINA A, SU UNA LINEA CELLULARE DI RENE DI MAIALE

Costa S.¹, Cervellati R.², Speroni E.¹, Utan A.¹, Guerra M.C.¹

¹Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna; ²Dipartimento di Chimica G. Ciamician, Università degli Studi di Bologna

Studi recenti hanno evidenziato l'importanza dello stress ossidativo nel meccanismo d'azione delle micotossine, in particolare dell'AFB1 e OTA. In questo studio è stato investigato l'effetto protettivo dell'EGCG e dell'ECG nei confronti dei danni citotossici indotti dall'OTA, in previsione di un eventuale utilizzo di queste due catechine come integratori per uso umano e animale. È stata quindi studiata la capacità di queste catechine nel ridurre la mortalità cellulare, la produzione di ROS e la frammentazione del DNA, indotte dalla micotossina su una linea cellulare di rene di maiale (LLC PK1). I nostri esperimenti hanno provato l'effetto citoprotettivo *in vitro* delle molecole in esame rispetto ai danni cellulari indotti da OTA. In particolare un pretrattamento di 24 ore con EGCG 30 μM , inibisce la citotossicità da OTA 10 μM del 35%, e da OTA 20 μM del 25% ($P < 0,001$), e un pretrattamento di 24 ore con ECG 60 μM inibisce la citotossicità indotta da OTA del 10% se OTA 10 μM e del 14% se OTA 20 μM ($P < 0,001$). EGCG 1 μM protegge le cellule LLC PK1 dai danni indotti da OTA se il pretrattamento viene effettuato per 8 giorni (60% di aumento della vitalità cellulare rispetto alle cellule trattate con OTA 10 μM , $P < 0,001$, e 49% rispetto alle cellule trattate con OTA 20 μM , $P < 0,05$). Inoltre entrambe le catechine diminuiscono la produzione di ROS indotta da OTA 25 μM : EGCG riduce la produzione di ROS del 44% se il pretrattamento viene effettuato alla concentrazione di 30 μM per 24 ore ($P < 0,05$), mentre ECG alla concentrazione di 60 μM per 24 ore riduce la produzione di ROS del 52% ($P < 0,001$). Anche la frammentazione del DNA indotta da OTA viene diminuita da un pretrattamento con le due catechine. La capacità di scavenger di radicali liberi delle catechine è stata studiata tramite un metodo chimico che si basa sulla reazione oscillante di Briggs – Rauscher. Questo sistema lavora a $\text{pH} \approx 2$. I risultati mostrano un buon potere scavenger in accordo con la capacità di diminuire i ROS intracellulari che hanno mostrato le due catechine.

Abbreviazioni: Ocratossina A (OTA), Epigallocatechina gallato (EGCG), Epicatechina gallato (ECG), Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

IL CONSUMO GIORNALIERO DI OLIO DI OLIVA AD ALTO CONTENUTO DI FENOLI ANTIOSSIDANTI RIDUCE IL DANNO OSSIDATIVO AL DNA IN LINFOCITI UMANI

Giovanelli L.¹, Pitozzi V.¹, Salvini S.², Palli D.², Caruso D.³, Visioli F.³, Mulinacci N.⁴, Dolara P.¹

¹Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi di Firenze;

²Centro per lo Studio e la Prevenzione Oncologica, Istituto Scientifico della Toscana, Firenze;

³Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano;

⁴Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Firenze

L'olio d'oliva è uno dei componenti caratteristici della dieta mediterranea, che è associata a una ridotta mortalità e incidenza di cancro e malattie cardiovascolari. Gli effetti benefici dell'olio d'oliva sulla salute vengono attribuiti in parte al suo contenuto in acidi grassi monoinsaturi e in parte alla frazione non saponificabile, contenente vitamine, fitosteroli, pigmenti, acidi terpenici, squalene, flavonoidi e composti fenolici. I fenoli presenti in maggior quantità nell'olio d'oliva sono il secoiridoide oleuropeina (OE), il tirosolo e l'idrossitirosolo (HT). Sia OE che HT sono potenti antiossidanti, come dimostrato in studi *in vitro* e *in vivo*. Lo scopo di questo studio è stato quello di misurare alcuni parametri di danno ossidativo in soggetti sani che consumavano olio di oliva a diverse concentrazioni di fenoli. Un olio extravergine ad alto contenuto (592 mg/kg di fenoli totali) è stato testato contro un olio extravergine a basso contenuto (147 mg/kg) in un trial randomizzato a due bracci in cross-over. I soggetti, dieci donne in post-menopausa, sostituivano tutti i grassi e gli oli abitualmente consumati con l'olio in studio, che assumevano alla dose di almeno 50 g al giorno, per un periodo di otto settimane. Seguiva un periodo di wash-out di altre 8 settimane e quindi 8 settimane di trattamento invertito. A ognuna delle 10 visite a cui i soggetti si sottoponevano durante il corso dello studio veniva effettuato un prelievo di sangue venoso per la misura del danno ossidativo al DNA nei linfociti circolanti con il comet assay, e della capacità antiossidante del plasma con il metodo ABTS. Venivano anche raccolte le urine delle 24 h per la valutazione dell'escrezione urinaria dei fenoli dell'olio e dei loro metaboliti. L'escrezione di HT e del suo metabolita alcool omovanillico era significativamente aumentata nei soggetti che consumavano l'olio ad alto contenuto di fenoli. In questi soggetti è stata misurata una riduzione statisticamente significativa del danno ossidativo al DNA nei linfociti circolanti, senza variazioni di rilievo delle rotture, della resistenza dei linfociti allo stress ossidativo indotto *in vitro*, e della capacità antiossidante del plasma. Questo studio mostra quindi che il consumo di un olio di oliva ad alto contenuto in fenoli antiossidanti esercita un'azione protettiva nei confronti del danno ossidativo in soggetti sani e che consumano abitualmente olio di oliva. Inoltre tali effetti protettivi sui livelli basali di danno ossidativo non sembrano essere legati all'attività riducente dei fenoli dell'olio, ma utilizzano probabilmente meccanismi più complessi.

EFFETTO ANTIOSSIDANTE DELLA CREATINA IN CELLULE DI MAMMIFERO IN CULTURA

Sestili P.^{1,2}, Martinelli C.², Piccoli G.^{2,3}, Agostini D.^{2,3}, Bravi G.², Gioacchini A.M.², Falcieri E.⁴, Curci R.⁴, Battistelli M.⁴, Stocchi V.^{2,3}

¹Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino;

²Istituto di Ricerca sull'Attività Motoria, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino; ³Istituto di Chimica Biologica G. Fornaini, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino; ⁴Istituto di Scienze Morfologiche, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino

La creatina (Cr) rappresenta uno dei depositi energetici fondamentali per l'organismo, e in particolare per il muscolo scheletrico, il cuore e il sistema nervoso centrale. La forma fosforilata della Cr, la fosfocreatina (CrP) rappresenta una fonte immediata di gruppi fosfato ad alta energia con i quali sostenere i livelli di ATP. La supplementazione con mega-dosi di Cr (necessarie per aumentare la CrP muscolare) è diffusamente praticata nell'ambito sportivo, e a tale riguardo è stata espressa preoccupazione per la reale sicurezza e innocuità di tale pratica. Nonostante non siano emersi dati allarmanti, resta però da chiarire se vi sia una effettiva utilità nell'assumere giornalmente elevatissime dosi di Cr. La Cr è una aminoguanidina, ed è noto che alcune sostanze a struttura aminoguanidinica esplicano attività antiossidante, proprietà che, per quanto riguarda la Cr, non è stata mai direttamente valutata in sistemi cellulari. Questo studio si è proposto di verificare se la Cr svolga effettivamente, e con quali modalità, un effetto protettivo nei confronti di diversi tipi di stress ossidativo utilizzando cellule di differente derivazione tissutale (U937, promonociti; HUVEC, endoteliali; C2C12, mioblasti murini) esposte a diversi agenti ossidanti. I risultati ottenuti hanno indicato che i) la Cr, a dosi paragonabili a quelle raggiungibili *in vivo*, esplica una significativa e simile citoprotezione nei tre tipi cellulari esposti a stress ossidativo ii) l'effetto non è riconducibile alla chelazione del ferro né a un incremento dell'attività di catalasi o glutatione perossidasi iii) mediante spettrometria di massa si è evidenziato, in soluzioni contenenti Cr, Fe²⁺ (10 nM) ed H₂O₂, la formazione di un prodotto di ossidazione (deaminazione ossidativa) della Cr con PM 136. Tale specie si forma anche in estratti di cellule U937 preincubate con Cr ed esposte ad H₂O₂ o ter-butildroperossido iv) l'effetto protettivo è interamente ascrivibile alla quota intracellulare di Cr: la supplementazione di Cr determina un significativo incremento dose- e tempo-dipendente del pool intracellulare. Ciò avviene solo in parte per la CrP: infatti appare molto diverso, nei tre tipi cellulari, il rapporto tra le concentrazioni intracellulari di Cr e della sua forma fosforilata (CrP/Cr C2C12>HUVEC>>U937). In conclusione la Cr migliora la sopravvivenza di cellule esposte a stress ossidativo con un meccanismo compatibile con una intrinseca attività antiossidante indipendente dalla maggior disponibilità di CrP: in quest'ottica tanto il valore nutrizionale della Cr in specifici gruppi di popolazione, quanto le usuali modalità di supplementazione, andrebbero criticamente riesaminate.

Progetto finanziato con fondi COFIN 2004 (P.S.)

EFFETTI DELL'ESERCIZIO FISICO PROLUNGATO SULL'ESPRESSIONE DI SUPEROSSIDO DISMUTASI E HEAT SHOCK PROTEIN IN CUORI DI RATTI ANZIANI

Boccuti S.¹, Corbi G.^{2,3}, Ferrara N.^{2,3}, Rinaldi B.¹, Cappetta D.¹, Capuano M., Rossi F.¹, Filippelli A.¹

¹*Centro di Eccellenza per le Malattie Cardiovascolari, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Farmacologia L. Donatelli, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli;* ²*Dipartimento di Scienze per la Salute, Università degli Studi del Molise;* ³*Dipartimento di Gerontologia, Geriatria e Malattie del Metabolismo, Seconda Università degli Studi di Napoli*

È noto che lo stress ossidativo e le ridotte difese antiossidanti, conseguenze dell'invecchiamento, abbiano un effetto deleterio sulla struttura e funzione cardiaca. In questo studio abbiamo valutato le modificazioni età-correlate dell'espressione di enzimi antiossidanti (Mn-SOD e Cu/Zn-SOD) e di proteine anti-stress come le Heat Shock Proteins (Hsp70 e Hsp27), in cuore di ratti anziani sottoposti a training fisico. Sono stati studiati 6 ratti Wistar maschi giovani (4 mesi, Y), e 18 ratti Wistar maschi anziani (24 mesi). Dei 18 ratti anziani, 10 (TO) sono stati sottoposti a training fisico per 8 settimane su tapis roulant e 8 (SO) non hanno partecipato al programma di allenamento. Dopo tale periodo sono stati registrati: frequenza cardiaca (HR), pressione arteriosa del ventricolo sinistro (LVSP) e LV dp/dt max. I ratti sono stati poi sacrificati e si è misurato il peso corporeo (BW), il peso del ventricolo sinistro (LVW) e il conseguente rapporto LVW/BW. Infine mediante Western Blot si è proceduto all'analisi qualitativa e quantitativa dell'espressione proteica di Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, Hsp27 ed Hsp70. Sia gli SO che i TO avevano un BW e LVW maggiore degli Y. Il rapporto LVW/BW era maggiore nei TO rispetto ai SO, come conseguenza di una riduzione del peso corporeo legata al training fisico. Inoltre i TO presentavano una HR e una LVSP significativamente più bassa degli SO, mentre gli Y mostravano una HR superiore ai TO. Non vi erano differenze riguardo il LV dp/dt max. L'espressione proteica di Mn-SOD e Cu/Zn-SOD non era significativamente modificata negli SO rispetto ai Y, mentre era molto più elevata nei TO rispetto ai SO ($p < 0,01$) e ai Y ($p < 0,01$). Hsp70 era significativamente ridotta nei SO rispetto ai Y ($p < 0,01$), mentre Hsp27 era significativamente aumentata ($p < 0,005$). Inoltre l'attività fisica prolungata induceva un significativo incremento nell'espressione di Hsp70 nei TO rispetto agli SO ($p < 0,05$); sebbene la sua espressione risultava più bassa rispetto ai Y ($p < 0,05$). Infine Hsp27 era significativamente aumentata nei TO rispetto ai Y ($p < 0,0005$) e ai SO ($p < 0,05$). I nostri dati evidenziano che il training fisico, negli animali anziani, riduce la HR, la LVSP e il BW e aumenta il rapporto LVW/BW inducendo modificazioni emodinamiche e strutturali del ventricolo sinistro. Inoltre, l'esercizio fisico prolungato contrasta in parte, a livello cardiaco, i cambiamenti età-correlati nell'espressione di proteine antiossidanti quali le SOD e le Hsps, suggerendo un possibile ruolo dell'attività fisica prolungata nella prevenzione di quelle condizioni cardiovascolari associate a danno ossidativo conseguente all'invecchiamento.

IL BLOCCO DEI RECETTORI MGLU1 DEL GLUTAMMATO PREVIENE L'AZIONE PRO- APOPTICA E IPERALGESICA DEI ROS IN UN MODELLO MURINO DI DOLORE NEUROPATICO

Fuccio C., Siniscalco D., Luongo L., de Novellis V., Rossi F., Maione S.

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Farmacologia, II Università degli Studi di Napoli

Recenti studi hanno evidenziato un importante coinvolgimento delle specie reattive all'ossigeno (ROS) nello sviluppo e nel mantenimento del dolore cronico. Abbiamo dimostrato, in recenti studi, un ruolo dei recettori metabotropici del glutammato (gruppo I) nell'apoptosi dei neuroni spinali in ratti con costrizione cronica del nervo sciatico (CCI). In questo studio, si dimostra che un potente ROS scavenger, il phenyl-N-tert-butylnitronone (PBN), è in grado di diminuire l'iperpressione dei geni pro-apoptici nel midollo spinale di topi neuropatici. RNA totale è stato estratto dalle lamine L4-L5 spinali di topi con legatura del nervo sciatico e di topi controllo. I livelli di mRNA dei geni regolatori dell'apoptosi sono stati misurati mediante RT-PCR semiquantitativa in riferimento all'espressione di un gene costitutivo (HPRT). La legatura nervo sciatico provocava l'insorgenza di iperalgesia termica e allodinia meccanica a 3 e 7 giorni dopo la legatura. L'analisi biomolecolare, condotta mediante RT-PCR, evidenziava un aumento del rapporto gene pro-apoptico/gene anti-apoptico (bax/bcl-2) ($77\pm 28\%$), dei geni pro-apoptici apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) ($117\pm 21\%$), caspase-9 ($48\pm 16\%$), e bid ($119\pm 26\%$) nel midollo spinale 3 giorni post-CCI. Il trattamento con PBN (100 mg/Kg i.p. twice, daily) riduceva l'iperalgesia termica e l'allodinia meccanica, 1 e 3 giorni post-CCI. Tale composto, inoltre, provocava una diminuzione dei livelli di mRNA dei geni bax, apaf-1, caspase-9 e bid 3 giorni dopo la lesione del nervo sciatico. Questo studio dimostra che l'apoptosi indotta dal glutammato nel midollo spinale di topi neuropatici può essere mediata dalle specie reattive all'ossigeno, e che molecole agenti come ROS scavengers potrebbero essere impiegate nel trattamento del dolore cronico.

Quarta Sessione Aula Dipartimento di Ambiente

**Stili di vita:
fumo, alcool e droghe d'abuso**

*Moderatori
P.F. Mannaioni, A. Nunziata*

BIAS NEI QUESTIONARI DI RILEVAZIONE DI ESPOSIZIONE AL FUMO: UNA REVISIONE DELLA LETTERATURA

Morandi S., Andreoli C., Bassi A., Nunziata A.
Centro Ricerca BAT-Italia, Napoli

Secondo Zammuner (1996) i questionari sono: “strumenti di raccolta delle informazioni, definiti come un insieme strutturato di domande, finalizzato all’ottenimento di un preciso set di informazioni, e relative categorie di risposta stabilite a priori da chi lo costruisce, ovvero di domande cosiddette “chiuse” dove all’intervistato (inteso come colui che risponde alle domande scritte del questionario) viene richiesto di individuare tra le risposte presentate quella che più si avvicina alla propria posizione, e/o di domande “aperte”, che non prevedono cioè delle risposte predeterminate”. A tali domande il soggetto può rispondere riportando e valutando la propria esperienza. Il questionario può essere anche autocompilato dall’intervistato stesso, attraverso interviste postali e online. Nella preparazione di un questionario si devono tener presenti sia principi generali che regole operative al fine di minimizzare errori nell’interpretazione e nella compilazione dello stesso, nonché risposte non veritiere, incoerenti o incomplete. Per ovviare a tutti questi possibili bias è necessario che il questionario sia breve, semplice, chiaro, neutrale, lineare e che ponga particolare attenzione alle cosiddette “domande delicate”, che potrebbero indurre imbarazzo, portando l’intervistato a dare una risposta non corrispondente alla realtà. Nel caso in cui vengano coinvolti intervistatori possono rendersi necessari sia opportuni addestramenti degli stessi che l’utilizzo di manuali con linee guida di conduzione dell’intervista. Nell’ambito degli studi sul fumo i più frequenti bias nei questionari sono legati soprattutto alle domande sulle abitudini di vita e al fumo, che risultano spesso incomplete o imprecise. Scopo di questo lavoro è individuare i bias maggiormente presenti e ripetuti nei questionari, attraverso l’analisi di alcuni studi condotti sia su coorti di fumatori e non fumatori che su soggetti esposti a fumo ambientale, presenti in letteratura. Lo studio, inoltre, si propone di stabilire un metodo per la validazione di un questionario *ad hoc*, il più preciso ed esaustivo possibile, per una miglior caratterizzazione dei rischi legati all’esposizione al fumo da utilizzare negli studi prospettici.

FATTORI NUTRIZIONALI, ABUSO ALCOLICO E DIFFERENZE DI GENERE: LA VITAMINA B1 E SUOI ESTERI

Mancinelli R., Binetti R., Attilia M.L.¹, Spagnolo P.A.¹, Romeo M.¹, Rotondo C.¹, Ceccanti M.¹
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ¹Centro Riferimento Alcolologico Regione Lazio (CRARL), Università degli Studi La Sapienza, Roma

La vitamina B1 (tiamina T) con i suoi esteri monofosfato(TMP) e difosfato (TDP o cocarbossilasi) entra in processi metabolici fondamentali e la sua carenza causa gravi complicanze tra cui la sindrome di Wernicke-Korsakoff. Nell'alcolista lo stato nutrizionale viene alterato e si può verificare carenza di tiamina. Sono stati esaminati campioni di sangue da controlli sani (45 uomini e 58 donne) e pazienti alcolisti cronici (62 uomini e 20 donne), afferenti al CRARL. La determinazione simultanea di T, TMP, TDP intraeritrocitari è stata effettuata con procedure di estrazione e rilevazione ottimizzate messe a punto dagli autori (HPLC isocratica, rivelazione fluorimetrica). Nei pazienti, senza segni clinici di carenza di tiamina, sono stati testati anche parametri biochimici di routine. I valori di T e TDP negli alcolisti risultano significativamente inferiori ai controlli: T=59,6±25,7 nmol/l vs. 89,6±22,7 nmol/l, TDP=123,8±43,7 nmol/l vs. 222,2±54,6 nmol/l ($p<10^{-5}$). TMP non mostra differenze significative. Sensibilità e specificità diagnostica variano da 67-94% e 85-94% rispettivamente, a seconda del cut-off prescelto e giustificano l'uso di questi parametri come biomarcatori di effetto e di esposizione. Differenze di genere significative si riscontrano nelle curve ROC di T e TDP dove l'AUC femminile risulta più vicina a 1. Significative differenze di genere si riscontrano anche per altri parametri biochimici quali GGT($p<0,06$), ALT($p<0,03$), ferritina ($p<0,04$). Negli alcolisti esaminati, l'età uomo-donna non è significativamente diversa, ma gli uomini hanno più anni di consumo a rischio (22,7±11,9, vs. 13,9±11,1, $p=0,07$) e l'età di primo uso è significativamente più bassa delle donne (20,3±6,4 vs. 24,8±10,2, $p<0,005$). Nelle donne la carriera alcolica è significativamente più breve ma compare maggiore vulnerabilità e più veloce progressione del danno. Interazione alcol/ambiente. La riduzione di nutrienti essenziali danneggia i meccanismi omeostatici e abbassa le difese da intossicazione rendendo nocive per l'alcolista concentrazioni di inquinanti considerate sicure per la popolazione generale. La tiamina è efficace antidoto all'intossicazione da piombo, uno dei metalli più diffusi nell'ambiente. Nell'alcolista essa risulta ridotta e la clearance del piombo è rallentata con aumento del rischio relativo di intossicazione. La popolazione femminile risulta particolarmente a rischio anche perchè lo sviluppo prenatale e postnatale sono significativamente compromessi dal piombo nell'organismo e l'effetto teratogeno del piombo si può sommare a quello dovuto all'alcol. Questo studio si svolge nell'ambito delle attività di ricerca coordinate del Progetto ISS/NIH "Woman, health, alcohol: risks and damages from alcohol in different women ages. The role of abuse markers".

ABUSO ALCOLICO E SISTEMA IMMUNITARIO

Mancinelli R.¹, Rigano R.², Buttari B.², Margutti P.², Ortona E.², Profumo E.², Colasanti T.², Delunardo F.², Mazzoli C.², Ceccanti M.³

¹Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Centro Riferimento Alcolico Regione Lazio (CRARL), Università degli Studi La Sapienza, Roma

Nell'ambito delle attività di ricerca coordinate del progetto collaborativo ISS/NIH "Woman, health, alcohol: risks and damages from alcohol in different women ages. The role of abuse markers" sono studiati alcuni effetti alcol-relati sul sistema immunitario: A) effetti dell'etanolo, *in vivo* e *in vitro*, sulla funzionalità delle cellule dendritiche; B) identificazione di autoantigeni associati all'instaurarsi di aterosclerosi precoce in donne alcoliste croniche.

A) *Materiali e metodi*: Cellule mononucleate sono state ottenute da campioni di sangue periferico di soggetti sani e pazienti alcol dipendenti secondo il DSM IV afferenti al CRARL. Le cellule dendritiche (DC), fatte differenziare in coltura a partire da monociti in presenza di GM-CSF e IL-4, sono state stimulate per 18 ore con l'aggiunta in coltura di etanolo (EtOH) 0,5-50 mM, in presenza e assenza di LPS (100 ng/ml). La variazione dei marcatori di superficie (CD14, CD1a, CD83, HLA-DR, CD40, CD80 e CD86) è stata analizzata mediante analisi citofluorimetrica. La funzionalità delle DC è stata valutata mediante la reazione linfocitaria mista (MLR), l'espressione di citochine (IL-12p70, IL-10, IL-1 β e TNF- α) e per l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B. *Risultati*: L'esposizione all'ETOH anche a dosi moderate influenza *in vitro* la maturazione delle DC indotta dall'LPS (non induzione di CD83; mancata up-regolazione delle molecole costimolatorie; inibizione dell'espressione di IL-12p70 e di TNF- α ; inibizione della attivazione di NF- κ B). L'alterazione fenotipica e funzionale osservata nelle DC trattate con EtOH sembrerebbe associata a una ridotta capacità di indurre una risposta proliferativa in linfociti T alloigenici. *Conclusioni*: I risultati suggeriscono che l'esposizione all'etanolo, anche a dosi moderate, può diminuire la funzionalità del sistema immunitario compromettendo la capacità di presentare l'antigene delle DC. Le DC ottenute da alcolisti presentano una diminuita capacità di rispondere a stimoli microbici.

B) *Materiali e metodi*: una libreria di espressione da endotelio dall'arteria del cordone ombelicale (HUAEC) è stata analizzata con il siero di donne alcoliste croniche (età < 40 anni) con aterosclerosi precoce diagnosticata mediante eco-doppler. I cloni positivi sono stati sequenziati. *Risultati*: Cloni identificati: 1) zinc finger protein 92 (HTF12) (ZNF92), 2) recombining binding protein suppressor of hairless (RBPSUH), 3) uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats (UACA), 4) SWAP-70 protein (SWAP70), 5) excision repair protein. *Conclusioni*: Ulteriori studi sono necessari per chiarire il legame tra gli anticorpi verso queste proteine e le manifestazioni aterosclerotiche negli alcolisti cronici. Disporre di antigeni ricombinanti può aiutare a definire il ruolo che specifici anticorpi giocano nei meccanismi autoimmuni legati all'insorgere di aterosclerosi precoce nell'alcolista

DOSAGGIO DI ECSTASY, AMFETAMINE E CANNABINOIDI IN FLUIDI BIOLOGICI

Mandrioli R.¹, Bugamelli F.¹, Baccini C.², Conti M.², Cantelli Forti G.³, Raggi M.A.¹

¹Laboratorio di Analisi Farmaco-Tossicologica, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna; ²Laboratorio di Farmacologia Clinica e Tossicologia, Ospedale S. Maria delle Croci, Ravenna; ³Dipartimento di Farmacologia Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

L'ecstasy e gli altri analoghi dell'amfetamina sono ampiamente usati come sostanze d'abuso o droghe "ricreative" che determinano una sensazione d'euforia e stimolazione fisica e psichica. I rischi dell'uso acuto di amfetamine sono problemi cardiovascolari fino all'infarto o all'ictus, disidratazione, danni muscolari o renali; dopo la fine dell'effetto farmacologico, si hanno depressione, disturbi dell'apprendimento e della memoria, difficoltà a concentrarsi. Gli effetti a lungo termine comprendono paranoia, allucinazioni, tendenze suicide e omicide. Per quanto riguarda i cannabinoidi, la loro azione consiste soprattutto nell'aumento della sensazione di benessere e di rilassamento, con un'intensificazione delle esperienze sensoriali. Gli effetti avversi più frequenti causati dal sovradosaggio sono ansietà e attacchi di panico, tachicardia e sbalzi di pressione. L'uso cronico può portare a dipendenza e a una lieve sindrome d'astinenza; altri effetti sulla psiche, l'apprendimento, il sistema immunitario e la gravidanza sono ancora controversi. Considerando l'amplessissima diffusione di queste sostanze, specialmente tra i giovanissimi, e la varietà degli effetti che possono provocare, è di notevole importanza poter disporre di metodi affidabili che permettano di confermarne l'uso da parte di un soggetto. Nella pratica clinica, per lo screening si utilizzano test immunochimici che danno risultati in tempi brevi, in maniera economica e standardizzata. Tali test permettono di escludere rapidamente i campioni negativi (che non contengono le sostanze o in cui la loro concentrazione è al di sotto di un valore soglia detto cut-off). Un campione risultato positivo nel test iniziale, se non verificato con un test di conferma cromatografico, può essere contestato e non ha valore medico-legale. Scopo di questo lavoro è lo sviluppo di metodi veloci e accurati per la determinazione di amfetamine e di cannabinoidi nelle urine e nel sangue. Poiché le amfetamine presentano fluorescenza nativa, per la loro analisi si è scelto di utilizzare un sistema HPLC con detector fluorimetrico. La separazione è stata ottenuta utilizzando una colonna C8 a fase inversa e, come fase mobile, una miscela composta da tampone fosfato a pH acido e acetonitrile. Come standard interno è stata utilizzata la chinina. La procedura di pretrattamento dei campioni biologici consisteva in una estrazione in fase solida con cartucce C2. Per l'analisi dei cannabinoidi, più lipofili, si è utilizzata una fase mobile con una più alta percentuale di acetonitrile; il pretrattamento del plasma è stato effettuato su cartucce C8. I metodi, attualmente in fase di convalida, sembrano essere idonei per l'analisi di amfetamine e cannabinoidi in urine e plasma.

STUDIO SULL'INDUZIONE DI DANNO AL DNA, MICRONUCLEI E ALTERAZIONI DEL CICLO CELLULARE PRODOTTI DA CONDENSATO DI SIGARETTA

Andreoli C.¹, Mercati F.¹, Marguglio V.², Flamma F.¹, Martino A.¹, Bassi A.¹, Caradonna F.², Sciandrello G.²

¹Funzione Ricerca, BAT-Italia S.p.A., Napoli; ²Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Palermo

Numerosi studi confermano l'associazione tra fumo di sigaretta e insorgenza di patologie polmonari, cardiovascolari e tumori. Il fumo, infatti, contiene diversi composti irritanti, mutageni e cancerogeni. Premesso che non esiste una sigaretta sicura, è comunque possibile attuare strategie per caratterizzare e ridurre il rischio. In questo studio, abbiamo utilizzato test *in vitro* per investigare i possibili meccanismi d'azione del condensato di sigaretta (CSC), ovvero la frazione particolata del fumo, assorbita nei polmoni del fumatore e successivamente metabolizzata. Analisi precedenti avevano dimostrato che il CSC, dopo 24h di trattamento, induce decremento della vitalità delle cellule Swiss3T3 (IC₅₀=130µg/ml), inibizione dell'efficienza di clonaggio (circa il 60% a 50 µg/ml) e attivazione delle caspasi già a partire dalla prima dose testata (25µg/ml). La natura degli effetti genotossici del CSC è stata analizzata con il Comet assay che ha evidenziato la capacità del CSC di indurre rotture a singolo e doppio filamento del DNA, dopo trattamenti per 90min e 3h, a partire dalla dose di 100µg/ml (p<0,001, Kruskal-Wallis). Il significativo aumento (p<0,001, Mann-Whitney U-test) delle rotture al DNA è stato osservato dopo 90min di esposizione a 100 e 150 µg/ml di CSC lascia ipotizzare che la componente ossidativa del danno indotto da CSC venga rapidamente riparata. Il saggio del micronucleo è stato effettuato su cellule trattate con 30µg/ml di CSC e osservate immediatamente dopo il trattamento e fino a 120h di coltura in terreno completo senza condensato. I risultati ottenuti hanno evidenziato un aumento significativo (p<0,005, t-Student) di cellule micronucleate dopo 72h di recupero. Utilizzando anticorpi anti-nucleari (ANA test) contro il cinetocore è stato possibile mettere in evidenza che il trattamento con CSC esplica prevalentemente un effetto clastogeno. La comparsa dei micronuclei solo dopo 72h dal trattamento sembra essere correlata al ritardo nella progressione del ciclo cellulare come indicano sia il decremento di cellule in mitosi osservato subito dopo il trattamento, sia l'accumulo dose-dipendente di cellule in G2/M.

EFFETTI DI UN AGONISTA DEI RECETTORI PER I CANNABINOIDI IN UN MODELLO DI ASMA ALLERGICO NELLA CAVIA

Giannini L.¹, Bani D.², Fabrizi F.¹, Uliva C.¹, Mannaioni P.F.¹, Masini E.¹

¹*Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi di Firenze;*

²*Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale, Sezione di Istologia, Università degli Studi di Firenze*

L'asma è una patologia infiammatoria cronica delle vie aeree, in continuo aumento sia per prevalenza che per mortalità. Le vie aeree sono interessate da processi infiammatori cui partecipano numerose cellule fra cui mastociti, eosinofili, linfociti T e macrofagi, che rilasciano diversi mediatori attivi sulla muscolatura liscia, sul microcircolo, sull'apparato mucosecerne e sulle terminazioni nervose. Questi complessi fenomeni infiammatori sono in gran parte responsabili sia delle manifestazioni cliniche che delle alterazioni funzionali evidenziabili nei soggetti asmatici. Sono note da tempo le proprietà broncodilatorie dei derivati della Cannabis Indica e recentemente è stata avanzata l'ipotesi di un possibile uso terapeutico dei cannabinoidi nell'asma. Lo scopo dello studio è stato quello di valutare gli effetti di un cannabinoide sintetico (CP55,940) in un modello di asma allergico. Cavia sensibilizzate con ovalbumina sono state poste in una camera respiratoria controllata ed esposte ad aerosol di ovalbumina. In alcune di queste, l'agonista CB₂/CB₁ CP55,940 (0,4 mg/kg) è stato iniettato i.p. 3 ore prima dell'esposizione all'antigene, in presenza o meno dell'antagonista CB₂ SR144528. Sono stati valutati i seguenti parametri: il tempo di latenza della comparsa di broncocostrizione, la gravità della tosse, la comparsa di dispnea, lo studio istopatologico del tessuto polmonare, l'analisi morfometrica dei mastociti polmonari (per valutare il contenuto in granuli), la valutazione dell'infiltrato eosinofilo (attraverso l'analisi immunistochemica della proteina basica maggiore eosinofila, eMBP). Rispetto alle cavia sensibilizzate ed esposte a ovalbumina, gli animali pre-trattati con CP55,940 hanno mostrato un significativo aumento del tempo di latenza della comparsa del broncospasmo e una significativa riduzione della gravità della tosse e della dispnea. Alle analisi istopatologiche, le superfici degli spazi alveolari e del lume bronchiale erano significativamente maggiori, e i parametri infiammatori risultavano ridotti (attivazione mastocitaria e infiltrato eosinofilo). Dai nostri risultati appare chiara l'attività antinfiammatoria e broncodilatatoria del CP55,940, anche se ancora molto resta da indagare riguardo ai meccanismi d'azione.

Quinta Sessione Aula Pocchiari
Nuove prospettive nell'utilizzo
di composti di origine naturale
per la prevenzione di eventi tossici

Moderatori
C.L. Galli, P. Hrelia

ISOTIOCIANATI E CHEMIOPREVENZIONE DEL CANCRO

Fimognari C.

Dipartimento di Farmacologia Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

È ormai ampiamente riconosciuta la relazione inversa tra consumo di vegetali e insorgenza di cancro. Ciò ha portato in anni recenti all'avvento della chemioprevenzione, una strategia per contrastare lo sviluppo neoplastico basata anche sull'impiego di fattori nutrizionali o dietetici. Una famiglia di vegetali particolarmente interessante è rappresentata dalle *Cruciferae*, la cui assunzione è associata a una ridotta incidenza di tumore del polmone, pancreas, vescica, prostata, tiroide, stomaco e colon, a sua volta ascrivibile alla presenza di composti bioattivi, quali gli isotiocianati (ITCs). Numerosi studi, sia *in vitro* che *in vivo*, rimarcano l'attività chemiopreventiva degli ITCs nei confronti del processo cancerogenico, imputabile essenzialmente alla modulazione del metabolismo dei cancerogeni e a effetti citostatici e citotossici su diverse linee tumorali. Un ITC particolarmente promettente è il sulforafane, presente a concentrazioni elevate nei broccoli. L'attività del sulforafane è stata indagata su due modelli cellulari: una linea T-linfoblastoide e linfociti T normali come controparte non trasformata, al fine di ottenere alcune informazioni preliminari sulla sua selettività d'azione. Sulla linea T-linfoblastoide, il sulforafane ha bloccato in modo dose-dipendente la progressione del ciclo cellulare ed ha incrementato la frazione di cellule apoptotiche. L'analisi della cinetica d'induzione del blocco proliferativo e dell'apoptosi ha indicato che tali eventi sono indotti in maniera indipendente attraverso l'incremento dei livelli di p53 e bax. Anche sui linfociti il sulforafane ha inibito la proliferazione cellulare, a dosi però marcatamente più alte rispetto a quelle attive sulla linea leucemica. Successivamente, gli effetti del sulforafane sono stati indagati su cellule caratterizzate da un diverso *status* molecolare del p53 (wild-type, knock-out, mutato a livello del codone 220) al fine di comprendere se una mutazione a carico di questo gene ne riduca o addirittura annulli l'attività. L'ITC ha inibito la crescita delle tre linee cellulari attraverso l'induzione di apoptosi. L'induzione di apoptosi osservata anche in cellule knock-out supporta un meccanismo p53 indipendente alla base dell'attività pro-apoptotica del sulforafane. Poiché le cellule con p53 mutato erano caratterizzate dalla resistenza alla doxorubicina, ne abbiamo analizzato la capacità di ripristinare la sensibilità alla doxorubicina. I risultati hanno evidenziato che l'ITC è in grado di ridurre marcatamente le dosi citotossiche di doxorubicina. Quest'ultimo meccanismo, associato all'assenza di effetti tossici nel corso dell'assunzione a lungo termine come alimento, suggerisce un potenziale impiego del sulforafane anche nella modulazione della farmacoresistenza. Nella loro globalità, i numerosi studi sugli ITCs ne supportano lo spiccato potenziale chemiopreventivo e una eventuale futura sperimentazione su campioni *ex vivo* da pazienti affetti da diverse patologie tumorali.

ISOTIOCIANATI E NEUROPROTEZIONE

Tarozzi A.

Dipartimento di Farmacologia Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Le principali malattie neurodegenerative come il Parkinson e l'Alzheimer sono caratterizzate da una elevata morte neuronale necrotica e/o apoptotica. Lo stress ossidativo a livello cellulare è considerato un importante fattore di rischio, responsabile dell'iniziazione e progressione del processo di morte neuronale. Attualmente c'è un interesse crescente verso gli isotiocianati (ITC), e in particolare il sulforafane (SF), molecole con proprietà "antiossidante indiretta" che derivano dall'idrolisi dei glucosinolati presenti nei vegetali del genere *Brassica*. Le proprietà antiossidanti degli ITC sono da imputare essenzialmente all'induzione di proteine e di enzimi che esercitano la loro azione protettiva nei confronti del danno ossidativo cellulare. La ricerca si è posta l'obiettivo di valutare la potenziale attività neurocitoprotettiva del SF in condizioni di danno ossidativo indotto *in vitro*. La sperimentazione è stata condotta mediante un approccio integrato di test che utilizza una linea di neuroni umani (SH-SY5Y) e permette la valutazione dei meccanismi cellulari diversi che sottendono la morte neuronale apoptotica indotta dal perossido d'idrogeno (H_2O_2). I risultati hanno mostrato che il trattamento dei neuroni con il SF (0,6-5 μM) era in grado di inibire, in maniera dose-dipendente, gli eventi apoptotici precoci e tardivi come la perdita del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) e la frammentazione del DNA indotta da H_2O_2 (300 μM). La concentrazione 5 μM di SF era responsabile della massima inibizione della perdita di MMP (70%) e della frammentazione del DNA (80%). La stessa concentrazione di SF ha dimostrato di inibire anche l'attivazione di esecutori del processo apoptotico quali la caspasi-9 e -3 (70%). In parallelo, i risultati di attività antiossidante hanno mostrato come i neuroni trattati con lo stesso intervallo di concentrazioni di SF presentavano un aumento della capacità di neutralizzare il danno ossidativo a livello del citoplasma. Inoltre, i neuroni evidenziavano un incremento dei livelli di glutazione (130%) e dell'attività degli enzimi glutazione-S-transferasi (60%) e glutazione perossidasi (70%). Questi risultati mostrano come il SF eserciti una azione citoprotettiva nei confronti della morte neuronale apoptotica *in vitro* indotta dal H_2O_2 , grazie alla sua capacità di potenziare le difese antiossidanti fisiologiche neuronali. Il SF si può configurare come una nuova molecola con potenzialità di impiego nel campo della prevenzione delle malattie neurodegenerative.

ANTOCIANINE, THE VERDE ED ESTRATTO DI IPERICO E INFIAMMAZIONE ACUTA E CRONICA

Cuzzocrea S.

Dipartimento Clinico e Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Torre Biologica, Policlinico Universitario, Messina

Studi epidemiologici hanno evidenziato che diete ricche di frutta e di verdure (ricche di residui fenolici) potrebbero prevenire determinate malattie in cui sono coinvolti i radicali liberi. Una grande quantità di prove circostanziali implica i radicali liberi derivati dall'ossigeno (in particolare, il superossido e il radicale idrossilico) e gli ossidanti ad alta energia (quale perossinitrito) come mediatori dell'infiammazione acuta e cronica. Qui abbiamo studiato l'efficacia terapeutica delle antocianine contenute nell'estratto di mora (cyanidin-3-*O*-glucoside che rappresenta circa l'80% del contenuto totale di antocianine), dell'estratto di *Hypericum perforatum* e dell'estratto del tè verde nei modelli animali di infiammazione acuta (pleurite indotta da carragenina (CAR) e cronica (colite indotta da DNBS). Qui riportiamo che la cyanidin-3-*O*-glucoside, l'*Hypericum perforatum* e l'estratto del tè verde esercitano un potente effetto antinfiammatori (per esempio l'inibizione della formazione dell'essudato pleurico, di infiltrazione delle cellule mononucleari, del grado degli indicatori clinici e del danno istologico) *in vivo*. Inoltre, il trattamento con i tre estratti riduce: (1) l'aumento nella colorazione (immunoistochimica) per la nitrotirosina e la poly (ADP-ribose) polimerasi (PARP) e (2) l'espressione della ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) e della cyclooxygenasi-2 (COX-2) nei polmoni dei topi trattati con carragenina e nei colon dei topi trattati con DNBS. In più, abbiamo dimostrato che questi eventi infiammatori sono stati associati con l'attivazione del fattore nucleare- κ B (NF- κ B) e del Trasduttore del Segnale e Attivatore della Trascrizione-3 (STAT-3) nel polmone. L'attivazione di NF- κ B e di STAT-3 è stata significativamente inibita dal trattamento con *Hypericum perforatum* e con l'estratto del tè verde. Presi insieme, i nostri risultati dimostrano chiaramente che il trattamento con cyanidin-3-*O*-glucoside, con *Hypericum perforatum* e con l'estratto del tè verde esercita un effetto protettivo e che parte di questo effetto può essere dovuto all'inibizione dell'espressione delle molecole di adesione relative alla via del perossinitrito con successiva riduzione del danno cellulare-mediato da neutrofili, e offre un nuovo approccio terapeutico per la gestione del danno del polmone.

PROTEINE DELLA SOJA E ATEROSCLEROSI

Lovati M.R.

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

Le proteine della soja, dopo che nel 1999 la Food and Drug Administration americana ha consentito l'etichettatura costituiscono un potente strumento dietetico per il trattamento dell'ipercolesterolemia in diversi gruppi di soggetti, dai bambini ai pazienti nefropatici. L'identità del/i componente/i della soja responsabile/i della caduta della colesterolemia è diventata di crescente interesse degli alimenti a base di proteine della soja come prodotti dietetici utili alla riduzione del rischio di malattia coronarica. L'effetto ipocolesterolemico delle proteine della soja è direttamente correlato ai livelli basali di colesterolo dei pazienti: le variazioni della colesterolemia sono massime (-27%) in soggetti con colesterolo maggiore di 7mmol/L e minime in pazienti con livelli di colesterolo borderline. Le ipotesi sul componente responsabile dell'effetto ipocolesterolemico include le fibre, gli isoflavoni e le proteine stesse. Sebbene non vi siano evidenze di una attività di riduzione del colesterolo con le fibre, studi condotti utilizzando un estratto etanolic di proteine della soja (senza isoflavoni) hanno indicato una perdita di effetto, ma anche l'estratto stesso (ricco in isoflavoni) non presenta attività ipocolesterolemica. Questi dati confermano che solo la componente proteica della soja è responsabile della riduzione del colesterolo, come osservato in modelli *in vivo* e *in vitro*. In soggetti ipercolesterolemici le proteine della soja sono in grado di attivare i recettori per le lipoproteine a bassa densità (LDL) inducendo una marcata diminuzione dei livelli di colesterolo totale e colesterolo LDL. Dati recenti evidenziano che la subunità alfa primo della globulina 7S, una delle principali proteine di riserva presenti nel seme di questa leguminosa, è in grado di attivare direttamente l'espressione del recettore per le LDL, come dimostrato sia in modelli *in vitro* che in modelli *in vivo* di ipercolesterolemia umana, fornendo quindi un nuovo meccanismo di riduzione del colesterolo, differente da quelli delle diete ipolipidiche e dai farmaci ad attività ipocolesterolemica, come le statine. Tuttavia, poiché è improbabile che grossi peptidi non digeriti possano attraversare la barriera intestinale ed entrare in circolo, l'identificazione dei peptidi potenzialmente attivi sulla modulazione del recettore delle LDL è l'obiettivo principale degli studi attuali. L'interesse nell'attività biologica delle proteine della soja non è, tuttavia, legato solo alla riduzione della colesterolemia ma anche dall'apparente associazione tra assunzione di proteine della soja e riduzione dell'incidenza di malattia coronarica. Recentemente è stata osservata, in un modello *in vivo* di placca soft umana, ottenuto in conigli alimentati con una dieta ipercolesterolemica contenente proteine della soja, una marcata resistenza all'ossidazione delle LDL, suggerendo un nuovo meccanismo di protezione vascolare esercitato da questo trattamento dietetico.

PIANTE ALIMENTARI E OTTIMIZZAZIONE PER NUOVE PROSPETTIVE

Morazzoni P., Riva A.
Indena S.p.A., Milano

Negli ultimi anni si è creato un vasto consenso nella comunità scientifica relativamente al ruolo che il consumo di prodotti contenuti in piante comunemente impiegate in campo alimentare può svolgere a livello della salute. In particolare, sono ormai un numero incalcolabile i dati pubblicati relativamente alla modulazione dell'incidenza di patologie cronico degenerative associata all'assunzione di particolari prodotti contenuti in piante edibili. Molto spesso l'analisi retrospettiva di questi studi evidenzia un *bias* molto importante legato alla natura eterogenea dei prodotti alimentari considerati e di conseguenza la grande massa di dati disponibili deve essere valutata molto attentamente in relazione alla composizione degli stessi. L'avanzamento tecnologico sia produttivo che analitico consente oggi di mettere a punto prodotti ottenuti da piante edibili che presentino un livello di standardizzazione molto elevato e in taluni casi completo di tutti i componenti della miscela complessa. In altri termini è oggi possibile preparare industrialmente in modo rigorosamente riproducibile prodotti multimolecolari che possono poi essere saggiati per le loro proprietà biologiche in studi controllati sia preclinici che clinici. Alcuni esempi di grande interesse possono oggi essere identificati con gli estratti standardizzati di semi d'uva, tè verde, pomodoro, semi di soia, lupino, mirtillo e altri. La rigorosa standardizzazione basata sull'accoppiamento di *Good Agricultural Practices* (GAP) e di *Good Manufacturing Practices* (GMP) abbinate a tecnologie analitiche quantitative (HPLC, HPLC-MS) e semiquantitative (Spettroscopia NMR, FT-IR e NIR) ha infatti permesso la preparazione industriale di estratti o frazioni altamente riproducibili di queste piante.

REAZIONI AVVERSE ALLE PIANTE MEDICINALI

Calapai G., Pieratti A., Mannucci C., Tedesco M., Caputi A.P.

*Dipartimento Clinico Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Sezione di Farmacologia,
Università degli Studi di Messina*

Il consumo di erbe medicinali è aumentato in tutti i paesi occidentali e continua a crescere in tutto il mondo. Uno dei fattori che più hanno contribuito a questo successo è la opinione diffusa nella popolazione che “naturale” equivale a “sicuro”. Di conseguenza le sostanze naturali sono giudicate non pericolose e sono consumate, in particolare le erbe medicinali, con la convinzione che non possano produrre effetti tossici. La pubblicazione negli ultimi anni di numerosi casi clinici che riportano gravi effetti tossici indotti dal consumo di prodotti a base di erbe medicinali smentisce questa convinzione e richiama l'attenzione sulla necessità di ampliare l'attività di farmacovigilanza orientandola anche nei confronti delle piante medicinali. A complicare le cose in questo ambito c'è l'evidenza che le reazioni avverse ai prodotti a base di erbe medicinali possono essere causate non solo dai principi attivi contenuti nelle diverse piante ma anche da problemi relativi alla qualità del prodotto acquistato. a esempio, reazioni tossiche possono essere indotte dalla presenza di metalli pesanti in misura eccedente quella tollerata o da contaminazioni da microrganismi. Sono stati inoltre documentati casi di adulterazione di prodotti naturali nei quali erano presenti, non dichiarati, farmaci di sintesi. Infine, bisogna sottolineare la possibilità di possibili interazioni che si possono verificare assumendo in associazione prodotti a base di erbe medicinali e farmaci di sintesi. Quanto sopra esposto rende la sicurezza delle erbe medicinali un argomento attuale che investe i sistemi sanitari in Europa e nel Mondo Occidentale. La Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha recentemente pubblicato le linee-guida sul monitoraggio delle erbe medicinali indicando gli obiettivi da raggiungere per rendere efficace la vigilanza sulle reazioni avverse. Questi includono: una chiara identificazione della natura degli eventi avversi; gestione efficiente dei rischi conseguenti; conoscenza del profilo rischio/beneficio delle singole piante medicinali. È nostra opinione che per poter raggiungere gli obiettivi prefissati sia fondamentale coinvolgere gli operatori sanitari (in primo luogo medici e farmacisti) informandoli sugli usi terapeutici, gli eventuali benefici e sui possibili rischi collegati all'uso delle piante medicinali più diffuse.

Quinta Sessione Aula Dipartimento di Ambiente

**Nuovi modelli sperimentali
per lo studio della tossicità
della riproduzione
e dello sviluppo**

Moderatori

E. Giavini, A. Mantovani

UTILIZZO DI TECNICHE BIOMOLECOLARI NELLO STUDIO DEI MECCANISMI D'AZIONE DI AGENTI TERATOGENI: IL MODELLO ACIDO VALPROICO

Massa V., Di Renzo F.

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano

L'acido valproico (VPA) è un farmaco antiepilettico comunemente impiegato in terapia clinica per il trattamento di diversi disturbi neurologici tra cui l'epilessia. Questa molecola è teratogena sia per l'uomo che in numerosi modelli sperimentali animali. Le tipiche malformazioni indotte dall'esposizione a VPA includono difetti del tubo neurale e malformazioni dello scheletro cranio-facciale e assile. Il meccanismo alla base della teratogenesi da VPA è tuttora sconosciuto. Due approcci sperimentali complementari sono stati usati in questo studio allo scopo di identificare il possibile meccanismo d'azione alla base dei difetti indotti dall'esposizione in gravidanza a VPA. L'espressione genica in tessuti embrionali post-esposizione a VPA è stata studiata utilizzando piattaforme di microarray. I primi sei somiti postotici di embrioni di topo di controllo e trattati sono stati isolati 6, 12, 18 e 24 ore dopo trattamento che avveniva per i.p. all'8,5 giorno post coitum (gpc) con due diverse dosi di VPA (238 e 476 mg/Kg). L'RNA estratto e amplificato veniva ibridato su cDNA microarray contenenti circa 5700 probes. L'analisi statistica dei risultati ha permesso di individuare 4 gruppi ontologici principalmente coinvolti nelle alterazioni geniche indotte in seguito a esposizione a VPA: il complesso delle deacetilasi istoniche, proliferazione e ciclo cellulare, citoscheletro e gtpasi. Tra questi geni, quelli coinvolti nel controllo epigenetico cellulare sono risultati di maggiore interesse. Gli enzimi deacetilasi istoniche (HDAC) partecipano nel controllo della compattazione della cromatina regolandone l'accessibilità per i fattori trascrizionali. Recenti dati di letteratura dimostrano che il VPA è un potente inibitore delle HDAC in modelli animali e cellulari esibendo attività iperacetilante. Si è voluto approfondire il coinvolgimento di questi meccanismi molecolari nella patogenesi da VPA: un'analisi dell'espressione proteica è stata condotta su embrioni di topo esposti in utero allo xenobiotico. In particolare, utilizzando un anticorpo anti-istone H4 iperacetilato, gli embrioni di controllo e embrioni esposti a VPA (400 mg/Kg) sono stati analizzati con tecniche di immunostochimica e di western blotting un'ora dopo il trattamento. I risultati indicano che l'esposizione a VPA induce iperacetilazione, soprattutto a livello del tubo neurale caudale e dei somiti, organi target dell'azione teratogena di questa molecola. Entrambi gli studi, quindi, indicano un coinvolgimento di fenomeni del controllo primario della trascrizione genica come primo evento della via patogenetica delle malformazioni indotte da acido valproico: le alterazioni della regolazione della compattazione della cromatina spiegherebbero i fenomeni cellulari e tissutali che portano in ultima analisi alle gravi malformazioni congenite osservate in seguito all'esposizione alla molecola in esame.

APPROCCI INTEGRATI *IN VITRO/IN VIVO* PER LO STUDIO DEI MECCANISMI DI AZIONE DI INTERFERENTI ENDOCRINI

Mantovani A.¹, Maranghi F.¹, Lorenzetti S.², Evandri M.G.³, Bolle P.⁴

¹Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Istituto Nazionale di Ricerca sugli Alimenti e la Nutrizione; ³Agenzia Italiana del Farmaco, Roma; ⁴Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università degli Studi La Sapienza, Roma

Gli Interferenti Endocrini (IE), un eterogeneo gruppo di contaminanti delle catene alimentari e dell'ambiente, presentano specifici problemi per la valutazione del rischio tra cui la molteplicità di potenziali tessuti-bersaglio e meccanismi di azione. Riguardo a quest'ultimo aspetto, dati recenti della letteratura internazionale mostrano come le interazioni fra specifici IE e recettori nucleari siano più varie e complesse di quanto ritenuto. La presente comunicazione riguarda i dati preliminari di due studi su potenziali IE effettuati integrando approcci *in vivo* e *in vitro*. L'insetticida clorurato Lindano altera lo sviluppo riproduttivo in animali da laboratorio attraverso meccanismi tuttora non chiariti. In topine CD1 esposte in utero abbiamo osservato effetti, ancorché di modesta entità, indicativi di una possibile interferenza con i recettori estrogeni, quali aumento del peso dell'utero, anticipo della pervietà del meato vaginale e alterazioni a carico di tessuti riproduttivi osservabili all'analisi istomorfometrica. Il Lindano non è un agonista di ER α o AR, i recettori nucleari più studiati per i meccanismi di azione di IE. Nonostante le crescenti informazioni sul rilievo di ER β nella fisiopatologia endocrina, i dati sono ancora limitati riguardo alle interazioni con xenobiotici. Pertanto abbiamo indagato la possibile interazione del Lindano con ER β mediante l'utilizzo di linee cellulari (LNCaP e PC-3) che esprimono ER β , ma non ER α . I trattamenti sono stati effettuati anche in combinazione con l'antagonista recettoriale ICI 162,780. I dati preliminari indicano che il Lindano è un possibile agonista di ER β . La Semicarbazide è un derivato dell'azodicarbonamide, sigillante nelle guarnizioni per vasetti di vetro per alimenti; a livello europeo sono state manifestate preoccupazioni per la possibile contaminazione di alimenti per l'infanzia e per l'insufficienza dei dati per la valutazione del rischio. In uno studio su ratti esposti nella fase prepuberale (23°-50° giorno di vita) abbiamo osservato effetti sullo sviluppo riproduttivo, in particolare un anticipo significativo del distacco del prepuzio, anche in assenza di evidente tossicità generale. La Semicarbazide non è stata sinora identificata come potenziale IE; pertanto, sono stati avviati, e sono tuttora in corso, studi *in vitro* per identificare eventuali interazioni a livello recettoriale. Risultati preliminari con *Saccharomyces cerevisiae* Lac-Z contenente esprime ER α umano mostrano che il composto non è un agonista recettoriale, ma riduce significativamente la risposta di ER α a ligandi fisiologici (17 β E) o farmacologici (4-idrossitamoxifene) a concentrazioni prive di citotossicità. Pertanto, la possibile attività antiestrogena della Semicarbazide merita ulteriori indagini. I risultati preliminari presentati indicano l'importanza di considerare lo spettro dei possibili meccanismi di azione di IE utilizzando approcci integrati *in vivo/in vitro*. Sito web "Interferenti Endocrini" <http://progetti.iss.it/inte/>

Il lavoro è stato effettuato nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata "Analisi del rischio correlato alla presenza di residui negli alimenti di origine animale" fasc. 4AF/F3

VALUTAZIONE DELL'EMBRIOTOSSICITÀ IN VITRO MEDIANTE L'UTILIZZO DI MODELLI COMPLEMENTARI

Zanoncelli S., Longo M., Colombo P., Brughera M.

Dipartimento di Preclinical Development, Nerviano Medical Sciences S.r.l., Nerviano

Nel campo dell'industria farmaceutica, i metodi di screening rapido e la chimica combinatoriale rendono a oggi possibile l'identificazione di un elevatissimo numero di potenziali nuovi farmaci. Queste nuove entità chimiche devono poter essere caratterizzate, oltre che per il loro profilo di attività, anche da un punto di vista preclinico in fasi precoci della ricerca mediante l'utilizzo di modelli altrettanto efficaci e rapidi. Tra le fasi più critiche della sicurezza di un farmaco c'è senza dubbio l'embriotossicità. Questo ci ha portato a prendere in considerazione vari modelli, a oggi utilizzati per studiare la biologia dello sviluppo normale, ma che potrebbero essere ben applicati anche allo studio tossicologico. I potenziali modelli differiscono per grado di complessità come indicatori biologici (da cellule a embrioni interi) e per gerarchie filogenetiche (dall'hydra al mammifero). Sfortunatamente nessun singolo modello è adatto a disegnare un quadro completo delle interazioni che si sviluppano tra madre e prodotto del concepimento. Si è quindi deciso di implementare una batteria di test *in vitro* che siano tra di loro complementari e che ci permettano di mimare e valutare importanti stadi o eventi dello sviluppo embrionale. Questa batteria comprende il modello delle colture di embrioni di ratto post-impianto (WEC – Whole Embryo Culture), il modello delle micromasse di arto e mesencefalo di ratto (MM – Micromass Teratogen Assay), la coltura dell'embrione di *Xenopus* (FETAX – Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus levis*) e di *Danio* (ZETAD – Zebrafish Embryo Teratogenesis Assay – *Danio rerio*). La batteria di test è stata utilizzata per valutare un ampio numero di composti appartenenti a diverse classi terapeutiche. Essa si è rivelata utile all'identificazione di molte sostanze in grado di interferire con il normale sviluppo embrionale, ha aiutato a classificare composti all'interno di serie omologhe e ha fornito informazioni cruciali per valutare i meccanismi di embriotossicità permettendo una interpretazione critica dei dati provenienti da studi *in vivo*. In conclusione, sebbene i test *in vitro* non possano al momento sostituire i test *in vivo*, i dati da loro forniti sono essenziali per ridurre l'attrito nei processi di "Discovery" e per valutare criticamente i dati ottenuti *in vivo* durante i processi di supporto al "Development" suggerendone meccanismi e rilevanza per uomo.

EFFETTI CELLULARI E MOLECOLARI DEI PERTURBATORI ENDOCRINI SULLA CAPACITÀ DI SVILUPPO DEGLI OVOCITI

Brevini T.A.L., Gandolfi F.

Istituto di Anatomia degli Animali Domestici, Università degli Studi di Milano

Al momento circa 60 sostanze chimiche sono state classificate come perturbatori endocrini (PE), cioè sostanze in grado di interferire con la sintesi, il trasporto, il metabolismo, il legame col recettore, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali. La stabilità chimica e la liposolubilità di questi contaminanti rende concreta la possibilità che possano rappresentare un serio rischio per la salute riproduttiva sia delle persone che degli animali. Gli ovociti rappresentano una popolazione cellulare permanente che si forma prima della nascita e quindi, è esposta agli insulti ambientali per un periodo che, nell'uomo dura decine di anni. La capacità dell'ovocita di sostenere lo sviluppo embrionale viene acquisita durante il lungo periodo che precede l'ovulazione. Tale capacità gioca un ruolo fondamentale nel periodo che intercorre tra la fecondazione e la cosiddetta attivazione del genoma embrionale quando l'attività trascrizionale dell'embrione diventa completamente funzionale. Qualsiasi alterazione di questi processi molto delicati porta a una significativa riduzione della capacità di sviluppo dell'embrione e, di conseguenza, della fertilità. Nel nostro intervento presenteremo un'analisi critica degli effetti causati da diversi PE sugli ovociti e sugli embrioni di animali domestici, delle dosi necessarie e della dinamica della loro esposizione. Infine descriveremo alcuni dei meccanismi cellulari e molecolari attraverso i quali i PE esercitano i loro effetti sull'ovocita. In particolare analizzeremo il ruolo del recettore per gli arilidrocarburi, della stabilità delle molecole materne di RNA messaggero e del rimodellamento citoplasmatico a cui va incontro l'ovocita durante il processo di maturazione.

Finanziato da MIUR Cofin 2003

SVILUPPO DI UN TEST TOSSICOLOGICO IN VITRO BASATO SU GAMETI ED EMBRIONI BOVINI

Lazzari G.

*Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione, CIZ srl, Istituto Sperimentale Italiano
Lazzaro Spallanzani, Cremona*

Lo sviluppo di test alternativi per il rilevamento della tossicità riproduttiva *in vitro* richiede una strategia di ampio respiro che comprende la molteplicità dei tipi cellulari coinvolti. In questo contesto si inserisce un progetto di ricerca europeo (acronimo ReProTect) finanziato nel 6° programma quadro. Il modello brevemente descritto di seguito fa parte del gruppo di test tossicologici alternativi che saranno sviluppati all'interno di Reprotect. Il test si basa sull'utilizzo di gameti ed embrioni bovini che vengono esposti alle sostanze chimiche in tre fasi diverse: a) maturazione *in vitro*, b) fecondazione *in vitro*, c) coltura *in vitro* degli zigoti fino allo stadio di blastocisti. Gli end points tossicologici delle tre fasi sono rispettivamente il raggiungimento della metafase II, la formazione dei due pronuclei e il raggiungimento dello stadio di blastocisti.

ESPRESSIONE DI MECCANISMI DI DIFESA IN RATTI ESPOSTI A PCB DURANTE LA GESTAZIONE E LA LATTAZIONE

Bonfanti P.¹, Colombo A.¹, Costa B.², Orsi F.¹, Comelli F.², Santagostino A.¹

¹*Dipartimento di Scienze dell'Ambiente del Territorio, Università degli Studi Bicocca, Milano;* ²*Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi Bicocca, Milano*

I bifenili policlorurati (PCB) sono una classe di composti con diverso grado di tossicità, particolarmente persistenti nell'ambiente e facilmente bioaccumulabili. Molto limitati sono i dati riguardanti la loro azione di perturbatori endocrini in seguito all'esposizione a PCB durante la gestazione e la lattazione. Questi periodi, caratterizzati da dispendio energetico, possono essere critici poiché i PCB, accumulati nel tessuto adiposo, vengono mobilizzati, messi in circolo o escreti nel latte, esponendo potenzialmente feto e neonato ad alte concentrazioni. Nel presente lavoro è stata indagata l'induzione di meccanismi di difesa quali citocromo P-450 e della proteina pompa P-170 in ratti esposti a una miscela di PCB durante la gestazione e la lattazione. A tale scopo una miscela di congeneri che si ritrovano negli alimenti (PCB 126, 138, 153 e 180) è stata somministrata giornalmente a due gruppi sperimentali a partire dal giorno 15 al giorno 20 di gestazione e fino al termine dell'allattamento, con cadenza bisettimanale, per il II° gruppo. Il contenuto totale di citocromo P-450 e l'espressione di CYP1A, 2B e di P-170, sono stati indagati in fegato di madri, feti e neonati. Inoltre, i livelli di P-170 sono stati valutati anche in placenta per indagare indirettamente l'efficienza di questa barriera. I risultati hanno evidenziato un incremento del contenuto totale di P-450 e un'induzione di entrambe le isoforme testate dopo trattamento con PCB in fegato di madri al giorno 20 di gestazione e al termine dell'allattamento (giorno 21). Risultati analoghi sono stati ottenuti in fegato di neonati allattati per 21 giorni da madri esposte a PCB. Al contrario, in fegato di feti espunti da madri esposte a PCB, il contenuto totale di citocromo e i livelli basali dell'isoforma 1A non si sono discostati dal controllo, mentre non è stato possibile evidenziare bande proteiche associabili all'isoforma inducibile 2B. I livelli basali di P-170, evidenziati in placenta e fegato di mamme, feti e neonati controllo, non hanno subito variazioni nei trattati. Concludendo, questi dati indicano che i meccanismi di difesa indagati non rispondono in modo coordinato alla miscela di PCB testata. Inoltre, poiché i feti non evidenziano induzione del citocromo P-450, si può ipotizzare che la placenta funzioni da barriera protettiva nonostante i livelli di P-170 non subiscano variazioni. I neonati invece risultano esposti alla miscela testata attraverso al latte, che rappresenta quindi un'importante via di escrezione dei PCB accumulati dalla madre, rendendo il periodo neonatale a rischio di esposizione a elevate concentrazioni di PCB.

Quinta Sessione Aula Marotta
Meccanismi molecolari di morte cellulare

Moderatori
O. Cantoni, L.G. Costa

ACIDO DOMOICO: MECCANISMI MOLECOLARI DI NEUROTOSSICITÀ

Giordano G.¹, Kavanagh T.J.¹, Costa L.G.^{1,2}

¹*Department of Environmental and Occupational Health Sciences, University of Washington, Seattle;* ²*Dipartimento di Anatomia Umana, Farmacologia e Scienze Medico-Forensi, Università degli Studi di Parma*

L'acido domoico (DA) è una neurotossina prodotta dalle alghe che ha causato diversi casi di intossicazione in seguito all'ingestione di molluschi contaminati. I sintomi che si manifestano in seguito alla intossicazione da parte del DA sono sia di natura gastrointestinale, sia di natura neurologica la cui eziologia è stata attribuita alla morte neuronale, dovuta all'attivazione dei recettori dell'acido kainico. Benché siano presenti in letteratura prove indirette di un coinvolgimento dello stress ossidativo nel meccanismo molecolare di morte cellulare indotto dal DA, manca uno studio completo e approfondito di tale ipotesi. Per investigare il ruolo dello stress ossidativo abbiamo utilizzato come modello colture primarie di neuroni granulari cerebellari (CGN) prelevate da topi wild-type [Gclm (+/+)] e CGN che mancano delle subunità regolatoria dell'enzima glutamil cisteina ligasi che catalizza la prima tappa limitante della sintesi del glutatone [Gclm (-/-)]. Le CGN [Gclm (-/-)] si dimostrano essere 10 volte più sensibili delle CGN [Gclm (+/+)] rispetto alla citotossicità indotta dal DA. Tale neurotossicità è antagonizzata dagli antagonisti dei recettori glutammatergici dell'AMPA/KAINATO e dell'NMDA. L'attivazione di questi ultimi è secondaria a un aumento del rilascio di glutammato da parte del DA. Diversi antiossidanti sono in grado di inibire la tossicità del DA. Il trattamento con DA induce un aumento della produzione di specie di ossigeno reattive (ROS) e un conseguente incremento dei livelli di malondialdeide (MDA), indice di perossidazione lipidica. Parallelamente alla produzione dei ROS, ha luogo una riduzione dei livelli di glutatone intracellulare, non dovuta a un aumento della sua forma ossidata né a una inibizione della biosintesi, ma a un incrementato efflusso extracellulare. L'ipotesi che il glutatone ricopra un ruolo chiave nel meccanismo indotto dal DA viene rafforzata dalla protezione offerta dal glutatone etil estere, che ripristinando i livelli intracellulari del tripeptide, protegge dalla morte cellulare. Questi risultati indicano che in CGN lo stress ossidativo media la morte cellulare indotta da DA attraverso una riduzione dei livelli intracellulari di glutatone.

LA MORTE CELLULARE CONSEGUENTE A STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO: UN MODO NUOVO PER SCONFIGGERE LE CELLULE TUMORALI

Piacentini M.

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi Tor Vergata, Roma; IRCCS-INMI Lazzaro Spallanzani, Roma

Danni o stress a carico di molti organuli cellulari possono innescare apoptosi attraverso numerosi meccanismi non ancora chiari. Una delle vie cellulari che determina morte viene indotta da condizioni di stress associate al reticolo endoplasmatico dovute all'accumulo di proteine non correttamente ripiegate che genera risposta UPR, e/o ad alterazioni nell'omeostasi del Ca^{2+} . Il retinoide sintetico fenretinide N-(4 idrossifenilretinamide) induce la morte di cellule tumorali e agisce in sinergia con farmaci chemioterapici genotossici, fornendo in tal modo le basi per nuovi approcci alla terapia del cancro. Gli eventi cellulari indotti precocemente dalla somministrazione di fenretinide includono un aumento dei livelli intracellulari di ceramide, mediato dalla glucosilceramide sintasi (GCS), che viene successivamente convertita a GD3. Tale ganglioside scatena l'attivazione di 12-Lox (lipossigenasi-12) con conseguente generazione di ROS e apoptosi di cellule tumorali neuroectodermiche. Abbiamo dimostrato che la morte indotta dal fenretinide in cellule tumorali neuroectodermiche dipende da aumentati livelli del fattore trascrizionale GADD 153 e della proteina Bak, membro appartenente alla famiglia Bcl-2. Tuttavia, resta da chiarire il legame che intercorre tra la produzione dei ROS e la successiva attuazione del programma apoptotico. Poiché Gadd 153 viene iper-regolato in condizioni di ER stress, abbiamo ipotizzato che il retinoide sintetico possa indurre morte cellulare mediante la risposta scatenata da ER stress. Abbiamo inoltre dimostrato che i ROS generati dal fenretinide determinano ER stress dando luogo allo splicing di Xbp-1 e alla fosforilazione di eIF2. Le analisi "microarray" hanno confermato il coinvolgimento dell'ER stress nell'apoptosi indotta da fenretinide, rivelando che Grp78, Calnexina e Calreticulina sono iper-regolati. Inoltre, le stesse analisi hanno portato alla luce il coinvolgimento di altri due geni legati all'ER - ERdj5 e ERp57 - quali geni iper-regolati durante lo stress da ER indotto da fenretinide in cellule tumorali neuroectodermiche. L'inibizione mediante silenziamento dell'mRNA (siRNA) sia di ERdj5 che di ERp57 è risultato in un'aumentata sensibilità da parte di cellule neuroectodermiche alla risposta apoptotica indotta da fenretinide. In studi precedenti avevamo dimostrato che il Reticulone 1C (RTN-1C) attraverso l'interazione funzionale con la GCS, era in grado di regolare l'attività pro-apoptotica del fenretinide. RTN-1C appartiene alla famiglia dei reticoloni, proteine specifiche neuroendocrine localizzate principalmente sulla membrana dell'ER. Malgrado sia noto il loro coinvolgimento in importanti processi cellulari come la rigenerazione assonale e la morte cellulare, il meccanismo apoptotico scatenato da tali proteine deve essere ancora delucidato. Abbiamo dimostrato che RTN-1C è in grado di modulare la sensibilità di cellule cancerose verso differenti vie apoptotiche in modo p53-indipendente. L'aumento dei livelli proteici di

RTN-1C determina esso stesso morte cellulare da ER stress in tumori neuroectodermici attraverso un incremento dei livelli citosolici di Ca^{+2} , e sensibilizza in modo significativo le cellule a diversi induttori di ER stress. D'altro lato, abbiamo riportato che farmaci genotossici perdono la loro efficacia a causa della traslocazione della proteina p53 nel citoplasma. Degno di nota è il fatto che la drastica riduzione dei livelli endogeni di RTN-1C è in grado di ripristinare la sensibilità delle cellule neuroectodermiche ai farmaci genotossici. Nel loro insieme, tali risultati dimostrano che l'ER stress esercita un ruolo chiave nella morte indotta dal fenretinide di cellule tumorali neuroectodermiche e indica ERdj5, ERp57 e RTN-1C come nuovi candidati bersaglio per lo sviluppo di futuri farmaci chemioterapeutici.

MODIFICAZIONI MITOCONDRIALI PRECOCI NELL'APOPTOSI DI LIFOCITI T

Malorni W.

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il mitocondrio svolge un ruolo centrale nel meccanismo di apoptosi intrinseca ed estrinseca. In entrambi i casi è stata individuata una serie di alterazioni specifiche che determinano il rilascio di fattori apoptogenici da parte del mitocondrio. Sia farmaci mitocondriotropici che, via t-Bid (la forma troncata di Bid) nell'apoptosi Fas-mediata, si verificano delle alterazioni specifiche della struttura e funzione del mitocondrio che determinano il triggering esecutivo dell'apoptosi. Tra queste alterazioni sono state individuate alcune modificazioni chiave (caduta del potenziale di membrana mitocondriale, rilascio di citocromo c e altri fattori come Endo G o AIF che attivano le caspasi a valle (caspasi 9) via formazione dell'apoptosoma. Ciò avviene in tutti i tipi cellulari, incluse le cellule tumorali e i linfociti T attivati. Tuttavia, le ricerche più recenti hanno posto due problemi fondamentali: 1. Qual'è il ruolo del mitocondrio nel processo di sensibilizzazione ad apoptosi?, 2. Qual'è il ruolo dei processi morfogenetici che determinano fusione e fissione mitocondriale nella suscettibilità e nella esecuzione dell'apoptosi? Le risposte a queste domande sembrano essere sostanzialmente due: 1) La sensibilizzazione ad apoptosi passa per una iperpolarizzazione mitocondriale che sembra essere evento determinante nel modulare e "facilitare" l'induzione di apoptosi, ciò avverrebbe come evento precoce e prima ovviamente della perdita del potenziale; 2) I processi di fissione del mitocondrio, associati a loro volta alla sensibilizzazione ad apoptosi, sono governati da numerose proteine (hFis, DRP1 etc). Queste modificazioni morfogenetiche determinano un remodeling mitocondriale che esita nella cascata enzimatica associata alla morte cellulare. L'analisi di questi processi nei linfociti umani ex vivo, in cellule senescenti e in cellule neoplastiche rappresentano modelli d'elezione paradigmatici per questi studi. L'impiego di booster proapoptotici o per converso di farmaci che modulano i processi di fusione/fissione mitocondriale sono quindi da considerare come approcci innovativi nel controllo del destino cellulare e nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche o di protezione nei confronti di agenti citotossici.

SFINGOMIELINASI E MORTE CELLULARE

Clementi E.^{1,2,3}, Perrotta C.^{1,2}, De Palma C.^{1,2}, Falcone S.^{1,2,3}, Sciorati C.²

¹Dipartimento di Scienze Precliniche LITA Vialba, Università degli Studi di Milano; ²Stem Cell Research Institute, IRCCS, Ospedale San Raffaele, Milano; ³IRCCS E. Medea, Bosisio Parini, Lecco

Le sfingomielinasi acida e neutra sono importanti enzimi nella complessa via di metabolismo degli sfingolipidi, generano ceramide per idrolisi dalla sfingomielina, e sono coinvolte nella regolazione di cruciali aspetti della vita cellulare, tra cui proliferazione, differenziamento e morte. Il loro ruolo è particolarmente importante in quest'ultimo processo. La sfingomielinasi acida, un enzima ubiquitario, è infatti attivata dalla maggior parte dei recettori apoptogeni, tra cui CD95, il recettore di tipo 1 per il TNF, il recettore a bassa affinità per le neurotrofine, i recettori toll-like, e la sua inibizione porta a protezione dalla morte cellulare. Nonostante l'importanza fisiopatologica di questo effetto, come la sfingomielinasi acida sia attivata e regolata nella sua attività è ancora poco noto. Similmente poco noti sono i meccanismi di attivazione e regolazione della sfingomielinasi neutra, un enzima clonato di recente e il cui ruolo è soprattutto il regolare il differenziamento di cellule dello stipe neuronale, endoteliale e monocito-macrofagico, anche attraverso l'induzione di morte apoptotica. Nostri studi recenti hanno dimostrato che un messaggero importante nella regolazione delle sfingomielinasi è il nitrossido (NO): in particolare, l'NO inibisce l'attività di questi enzimi e questo evento è responsabile in buona parte dell'effetto protettivo di NO contro la morte cellulare *in vitro* e *in vivo*. In questo intervento si discuterà di come la dissezione degli eventi sottostanti l'inibizione da parte di NO dell'attività delle sfingomielinasi possa aiutare a comprendere il complesso meccanismo di attivazione e funzionalità di questi enzimi. Si discuterà anche di come le sfingomielinasi stesse, in particolare la isoforma neutra, siano in grado di attivare la NO sintasi endoteliale, generando così un loop autocrino di regolazione che nelle cellule dell'endotelio vascolare svolge un importante ruolo di modulazione dell'attivazione da parte di stimoli infiammatori, quali il TNF.

MECCANISMI DI SOPRAVVIVENZA AL PEROSSINITRITO IN CELLULE DEL LINEAGGIO MONOCITICO/MACROFAGICO

Cantoni O., Tommasini I., Cerioni L., Guidarelli A., Palomba L., Carloni E.
Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino

Utilizzando una linea cellulare promonocitica (U937), ma riproducendo risultati critici in diversi tipi cellulari appartenenti al lineaggio monocitico/macrofagico (inclusi monociti e macrofagi umani), abbiamo dimostrato che concentrazioni sub-tossiche di perossinitrito inducono effetti mitocondriali potenzialmente in grado di evocare transizione della permeabilità della membrana mitocondriale interna (MPT) e una successiva, rapida morte di tipo necrotico. Tale “commitment” è regolato in modo critico dall’accumulo mitocondriale di Ca^{2+} , che prende luogo a seguito della mobilitazione del catione dai siti sensibili alla rianodina. La MPT, e la morte cellulare, vengono tuttavia prevenuti dal parallelo innesco di un signalling citoprotettivo mediato dall’attivazione della PLA_2 citosolica (c PLA_2) che libera acido arachidonico, a sua volta metabolizzato dalla 5-lipossigenasi (5-LO) con conseguente rilascio di metaboliti che promuovono la traslocazione mitocondriale della $PKC\alpha$. In queste condizioni, la $PKC\alpha$ promuove la traslocazione di Bad dal mitocondrio al citosol, prevenendo così l’eterodimerizzazione dello stesso con Bcl-2. Pertanto, questa cascata di eventi crea condizioni ottimali per l’attività anti-MPT di Bcl-2 e impedisce che il danno mitocondriale mediato dal perossinitrito sia seguito dalla necrosi MPT-dipendente. Esistono meccanismi alternativi per indurre la traslocazione di Bad, e quindi la sopravvivenza. La PGE_2 esogena, largamente presente nei siti infiammatori, media traslocazione di Bad attraverso un meccanismo PKA-dipendente. Inoltre, Bad potrebbe traslocare a seguito della fosforilazione mediata dalla PI-3 chinasi/Akt, ma questo evento non si osserva a causa della inibizione mediata da processi di ADP-ribosilazione. L’inibizione della poli(ADP-riboso)polimerasi-1, tuttavia, evoca la traslocazione di Bad via PI-3 chinasi/Akt, e induce sopravvivenza, in cellule in cui il meccanismo di traslocazione di Bad $PKC\alpha$ -dipendente era stato inibito. Questa ridondanza di meccanismi fornisce garanzie di sopravvivenza ma, eventualmente, utilizzando crescenti concentrazioni di perossinitrito, la morte cellulare si osserva anche in questi tipi cellulari. Tale evento è strettamente dipendente dalla formazione di H_2O_2 , prodotto dalla dismutazione dei superossidi generati a livello del complesso III, ma non è conseguenza dell’induzione di un ulteriore danno alle biomolecole. Infatti, l’ H_2O_2 inibisce il signalling citoprotettivo arachidonato-dipendente attivando tirosine fosfatasi che, defosforilando ERK1/2, impediscono la fosforilazione, e attivazione, mediate da queste chinasi sulla c PLA_2 e 5-LO. Inoltre, va rilevato che concentrazioni intrinsecamente tossiche di perossinitrito causano deplezione di GSH e che, in queste condizioni, Bcl-2 perde la sua attività anti-MPT. In conclusione, cellule appartenenti al lineaggio monocitico/macrofagico, sopravvivono al perossinitrito perché in grado di rispondere a molecole largamente disponibili nei siti infiammatori con un signalling che impedisce la MPT. Concentrazioni intrinsecamente tossiche di perossinitrito evocano morte cellulare attraverso l’inibizione del signalling citoprotettivo.

MECCANISMI MOLECOLARI DELL'APOPTOSI INDOTTA DA PIRIMETAMINA IN LINFOCITI T UMANI

Giammarioli A.M.¹, Gambardella L.¹, De Felice M.², Giovannetti A.³, Malorni W.¹, Pierdominici M.²

¹*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ²*Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ³*Dipartimento di Medicina Clinica, Divisione di Immunologia Clinica, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

La pirimetamina (Pyr), è un antagonista dell'acido folico utilizzato comunemente nel trattamento della malaria da *P. falciparum*. Oltre all'attività antiprotozoaria la Pyr ha evidenziato caratteristiche immunomodulanti sui linfociti del sangue periferico. Recentemente la Pyr è stata introdotta nel trattamento della Sindrome Linfoproliferativa Autoimmune (ALPS), malattia pediatrica rara caratterizzata da mutazioni a carico di CD95/Fas, FasLigand con difetti nel controllo dell'omeostasi linfocitaria, linfadenopatia, splenomegalia e manifestazioni autoimmuni. Il trattamento con Pyr dell'ALPS induce un miglioramento nelle condizioni cliniche associato all'induzione della morte cellulare per apoptosi. Tuttavia i meccanismi molecolari responsabili dell'effetto pro-apoptotico della Pyr sono a oggi poco chiari. In questo lavoro suggeriamo che: i) la Pyr induce di per sé apoptosi in linfociti T umani ottenuti dal sangue periferico; ii) il meccanismo di morte indotto da Pyr passa attraverso l'attivazione delle caspasi 8/10 e solo secondariamente coinvolge l'attività mitocondriale e il rilascio delle molecole apoptogeniche; iii) la Pyr non necessita del coinvolgimento recettoriale CD95 /Fas per la sua attività. Nel loro insieme, questi dati sembrano suggerire per la Pyr un meccanismo apoptotico che utilizza la stessa cascata caspatica di CD95/Fas senza coinvolgere il recettore di per sé. Sulla base di questi risultati sarebbe interessante rivalutare l'utilizzo della Pyr per il trattamento di disordini immunolinfoproliferativi caratterizzati da difetti di CD95/Fas.

**Sessione Plenaria Aula Pocchiari
dedicata a Marvin S. Legator**

*Moderatori:
G. Cantelli Forti, A. di Domenico*

**METABOLIC AND DNA REPAIR POLYMORPHISMS
AND SUSCEPTIBILITY TO ENVIRONMENTALLY-
INDUCED GENETIC DAMAGE:
A TRIBUTE TO MARVIN S. LEGATOR**

Abdel Raman S.Z.

*Department of Preventive Medicine and Community Health, Division of Environmental
Toxicology, University of Texas Medical Branch*

Comunicazione orale in onore di Marvin S. Legator

TOSSICITÀ DELLE NANOPARTICELLE

Gatti A.M.

Laboratorio di Biomateriali, Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

Il progetto Europeo QLRT-2002-147, avvalendosi di studi di microscopia elettronica a scansione di tipo ambientale secondo una metodica originale e innovativa, ha permesso di accertare come tessuti patologici relativi a malattie criptogeniche di natura oncologica o infiammatoria presentino un contenuto di particelle inorganiche di dimensioni micro- e/o nanometriche (10^{-8} – 10^{-5} m), un reperto non rinvenibile, invece, nei tessuti sani. L'origine di queste particelle è prevalentemente ambientale, dovuta a forme d'inquinamento sia antropiche sia, in modo meno rilevante, naturali, e la via d'ingresso nell'organismo umano e animale è attraverso l'inalazione e/o l'ingestione. Le particelle entro le dimensioni di cui si è detto (10^{-8} m è il limite della strumentazione utilizzata per la ricerca), una volta inalate, sono in grado di entrare dall'alveolo polmonare nel circolo ematico in tempi assai brevi (un minuto per quelle nanometriche) e, qui, in soggetti predisposti, esplicare un'azione trombogenica. Il circolo, poi, le trasporta a vari organi interni (fegato, reni, cervello, ecc.) dove vengono sequestrate e dove si comportano come corpi estranei, inducendo la formazione di granulomi e uno stato infiammatorio. È noto come una flogosi cronica possa costituire uno stato precanceroso. La fagocitosi macrofagica appare inefficace nell'eliminazione di questo particolato, dato che la particella è in ogni caso non biodegradabile e, di conseguenza, morto il macrofago, questa resta presente nell'organismo che non pare possedere vie d'eliminazione efficienti. In alcuni casi, è stato possibile osservare ex vivo particolato delle dimensioni fino all'ordine di grandezza delle centinaia di nanometri penetrato all'interno di cellule, fino al nucleo, senza lesioni nella membrana. Nei circa 400 casi patologici finora indagati, oltre a risultare non biodegradabili, le particelle sono anche state classificate come non biocompatibili, e quindi, per definizione stessa, patogene. A quanto appare dagli studi fin qui condotti, la nocività del particolato dipende principalmente dal suo stesso essere corpo estraneo, ma la sua natura chimica e la conseguente tossicità dei componenti, la sua area di superficie, la sua dimensione, la sua forma sterica e la sua concentrazione sono fattori che contribuiscono in modo sensibile ad aumentarne la capacità d'indurre patologie. Soprattutto critica è la concentrazione a livello tissutale, per cui è evidente che esiste una soglia al di sotto della quale non paiono innescarsi processi patologici. Resta da stabilire quale questa soglia sia e come sia valutabile. Così come resta da stabilire se una simile soglia esista per il particolato penetrato nel nucleo cellulare. La patogenicità del particolato inorganico micro- e nanometrico è stata confermata *in vitro* su cinque tipi diversi di particelle, in corpore vili su ratti nei quali è stata provocata l'insorgenza di un rhabdomyosarcoma con l'iniezione sottocute di particolato, e tramite diverse centinaia di casi clinici studiati, alcuni dei quali anche di natura veterinaria. Il progetto ha dato vita a una nuova branca della scienza chiamata Nanopatologia che ha permesso, tra l'altro, di prevedere con largo anticipo l'insorgenza di malattie simili alle cosiddette sindromi del Golfo e dei Balcani (anch'esse appartenenti a questa classe di affezioni) nei soggetti scampati al crollo del World Trade Center di New York e nei soccorritori.

PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT: A RISK ASSESSMENT PERSPECTIVE

Tarazona J.V.

Department of the Environment Spanish National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA) Madrid

Pharmaceuticals are assumed to be the most regulated chemical group all around the world. However, these regulations focus on the risk associated to the expected use and scarcely cover environmental exposures. In recent years, the improvement in analytical methods and the work conducted by several research projects has identified the presence of low levels of pharmaceuticals in all environmental compartments. Some field evidences and the lack of ecotoxicological data raised concerns on the potential risk of these substances to the exposed ecosystems. The identification of some pharmaceuticals in drinking water raised a second question regarding human pharmaceuticals. Assessing the risk of the pharmaceutical to the patient is an essential requisite; however, these risks are balanced against the benefits expected from the treatment, and follow very strict dosing schemes. The human environmental exposure to pharmaceuticals is orders of magnitude below that expected from actual treatment; however, may be continuous, starting at the placenta, covering all developmental phases, and does not produce any benefit. Similarly to other contaminants, the environmental risk assessment of pharmaceuticals may be an essential element not only for assessing potential ecosystem consequences, but also for a further integration with the human health risk profile for covering indirect/environmental exposures. As a consequence, the European regulations have included environmental risks in the registration process of veterinary and human pharmaceuticals, although there is still a long way for a full implementation. This presentation focuses on the assessment of environmental/ecological risks, describing the needs, state of the art, and on-going activities for developing scientifically sound protocols. The differences between veterinary and human pharmaceuticals are specifically covered; and some proposals for including available pharmacokinetic and pharmacodynamic information within the risk assessment are also presented. Finally, options and alternatives for integrating the assessment of ecosystems and indirect (environmental exposure) human health consequences will be discussed.

Acknowledgements: This work has been funded in part by the EU Project ERAPharm, contract No 511135.

APPLICAZIONI DI TOSSICOGENOMICA E PROTEOMICA ALLO SVILUPPO PRECLINICO DEL FARMACO

Venturi M.

*Investigative Sciences Attrition Reducing Technologies Nerviano Medical Sciences S.r.l.,
Nerviano*

Le tecnologie di genomica e proteomica di supporto a studi di tossicologia e ADME hanno progressivamente raggiunto la loro maturazione e sono attualmente applicabili alla risoluzione di problemi specifici durante lo sviluppo preclinico di molecole candidate a divenire farmaci. In questa presentazione verrà descritto come la tossicogenomica e proteomica vengano utilizzate negli studi *in vivo*, quali siano i criteri fondamentali da rispettare nella raccolta, stoccaggio e analisi del campione e dei dati da questo derivati e come tali dati siano in grado di corroborare un appropriato *safety assessment* a livello molecolare. Inoltre si porteranno esempi concreti di tali applicazioni, in cui analisi integrate di tossicogenomica e proteomica abbiano permesso l'identificazione di biomarcatori indicativi del meccanismo molecolare di tossicità e quindi la messa a punto di un sistema di saggio *in vitro* per la valutazione del profilo tossicologico di diverse molecole.

Sesta Sessione Aula Pocchiari
Aspetti regolatori nello sviluppo
di nuove molecole

Moderatori:

C. Bernardi, A. Meneguz, M. Weber

IMPLEMENTAZIONE DELL'APPROCCIO TOSSICOGENOMICO NELLA VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA DEL FARMACO NEGLI STUDI PRECLINICI

Chiusolo A., Cristofori P.

Safety Assessment Department, GlaxoSmithKline Research Centre, Verona

Nel tentativo di migliorare l'efficienza del processo di selezione e valutazione di nuovi composti farmaceutici, l'approccio tossicologico è attualmente indirizzato verso l'utilizzo di tecnologie molecolari atte ad aumentare il potenziale conoscitivo, sia per quanto riguarda l'identificazione di organi bersaglio che gli associati meccanismi tossicologici. I classici test tossicologici preliminari sono riconosciuti essere limitati a causa della numerosità degli animali utilizzati e della difficoltà interpretativa dei risultati. Le tecniche molecolari, e la tossicogenomica in particolare, permettono di diminuire la soglia di sensibilità nel definire l'effetto sull'organo bersaglio e potenzialmente di individuare meccanismi di tossicità inaspettati sulla base dell'effetto farmacologico del composto. È quindi in questo ambito che si colloca la tossicogenomica, che combina la tossicologia tradizionale con le tecnologie emergenti, quali genomica e bioinformatica. Valutando l'espressione di diversi geni in seguito all'esposizione ai composti testati, è potenzialmente possibile predirne gli effetti. A medio termine, ci si aspetta che la tossicogenomica faciliti l'efficienza nello screening dei nuovi composti in fase precoce dello sviluppo, riducendone quindi i tempi e i costi associati. In questa presentazione, verrà analizzato il processo di implementazione di questa tecnologia applicato ai protocolli di studi tossicologici di screening e le nuove esperienze atte a correlare la tossicogenomica con i dati clinici, biochimici e istopatologici.

DISEGNO, UTILIZZO E PREDITTIVITÀ DEGLI STUDI PRELIMINARI IN SPECIE NON RODITRICI NELLO SVILUPPO TOSSICOLOGICO DEI FARMACI

Ciabini D., Terron A., Galassi G., Raimondo S.

Safety Assessment Department, GlaxoSmithKline Research Centre, Verona

Durante lo sviluppo tossicologico dei farmaci l'utilizzo dei non roditori prevede nella maggior parte dei casi studi preliminari nel cane o nel primate. Di conseguenza, gli studi preliminari condotti in queste specie rivestono un'importanza particolare in termini etici, economici (costo dell'animale da esperimento e quantità di composto necessaria) e scientifici. In aggiunta, i dati preliminari ottenuti nel non roditore rivestono spesso un ruolo importante nella selezione e candidatura di nuove molecole per l'eventuale sviluppo. Detti studi vengono generalmente descritti come "maximum tolerated dose (MTD)", "maximum repeatable dose (MRD)" o "dose range finding (DRF)". La priorità scientifica del disegno dello studio è quindi quella di stabilire il più precisamente possibile la dose più alta alla quale si intende condurre lo studio per dose ripetuta a supporto della prima somministrazione nell'uomo. La priorità etica è quella di utilizzare il minor numero di animali possibile e produrre dei dati il più predittivi possibile onde evitare ripetizioni dello studio stesso. La priorità economica prevede l'utilizzo del minor numero di animali, l'ottenimento dei dati nel minor tempo possibile e l'utilizzo di quantità limitate di composto. A questo si aggiunge la priorità nella raccolta di informazioni riguardanti la sviluppabilità dei nuovi composti con la relativa richiesta di informazioni tossicocinetiche, tossicità d'organo, dose correlazione nella risposta e potenziale valutazione del rischio. Consci del compromesso, il disegno degli studi preliminari dovrebbe soddisfare tutte queste esigenze, in particolare gli aspetti etici. Per i farmaci attivi sul sistema nervoso centrale la combinazione degli studi di MTD e DRF sembrerebbe essere quella che incontra il maggior numero di consensi. Nel seguente lavoro diversi disegni di studio vengono presentati e confrontati in termini di successo nella capacità di scegliere correttamente la dose più alta per gli studi a dose ripetuta di tipo regolatorio, di uso etico degli animali e di quantità di informazioni raccolte utili nella valutazione di "svilupabilità" di nuovi composti. Le ragioni di insuccesso nella selezione delle dosi e i fattori che aumentano la predittività quali la lunghezza dello studio e la numerosità degli animali vengono presentati e discussi.

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ IN RATTI GIOVANI DURANTE IL PERIODO POST-NATALE SEGUITO DA UN PERIODO DI RECUPERO

Cicalese R., Valdoni L., Sisti R., Brightwell J.
RTC, Research Toxicology Centre S.p.A, Pomezia, Roma

È un equivoco piuttosto comune considerare i bambini come piccoli adulti, sui quali poter utilizzare i farmaci sperimentati secondo linee guida, che prevedono uno sviluppo clinico nell'adulto. Spesso un bambino viene paragonato a un adulto di piccole dimensioni e la posologia dell'adulto viene applicata all'infante sulla base del peso corporeo. Lo sviluppo ormonale, i cambiamenti metabolici, la crescita e la maturazione degli organi che si hanno nel corso dell'infanzia e dell'adolescenza, determinano sostanziali differenze tra adulti e bambini. Ne conseguono altrettante differenze nella modalità d'azione, eliminazione e, quindi, nei dosaggi da somministrare. Queste differenze sono tali da richiedere studi specifici di sicurezza ed efficacia sulla popolazione pediatrica. Va precisato, tuttavia, che considerando le problematiche etiche connesse alle sperimentazioni sui bambini, nonché al forte impegno economico da sostenere da parte delle industrie farmaceutiche, le grosse aziende sono poco propense a investire tempo e risorse per realizzare studi pediatrici. Anche in questo campo, come già fatto per la "teratogenesi", la Tossicologia Preclinica può venirci in aiuto, proponendo studi *ad hoc*, che vengano condotti su animali giovani e impuberi, permettendo quindi di avere una situazione simile a quella pediatrica. Nello schema sperimentale dello studio condotto in RTC gli animali sono stati dosati dal giorno 4 al giorno 21 *post partum*. Parte degli animali sono stati sacrificati al giorno 22 *post partum*, parte dopo 7 giorni di recupero e il restante dopo 11 settimane di recupero. I seguenti parametri sono stati valutati: peso corporeo, reazioni al trattamento, test neurocomportamentali e apprendimento (distaccamento delle orecchie, crescita del pelo, apertura completa degli occhi, eruzione degli incisivi superiori discesa dei testicoli, raddrizzamento in aria, risposta allo spavento (uditivo), riflesso pupillare, attività locomotoria, orme podali, vigore muscolare, y-maze test). Alcuni di questi test sono stati ripetuti settimanalmente durante il periodo di recupero.

USO E LIMITI DELLA NO OBSERVED ADVERSE EFFECTS LEVEL NELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO NEGLI STUDI PRECLINICI DURANTE LO SVILUPPO DEI FARMACI

Terron A., Moccia L., Raimondo S.

Safety Assessment Department, GlaxoSmithKline Research Centre, Verona

L'insieme dei dati generati nel corso degli studi preclinici ha quale scopo principale quello di identificare gli effetti "avversi" nel contesto del disegno dello studio, della specie usata e della dose utilizzata. Tali dati possono venire presentati utilizzando diverse metriche quali la "No observed adverse effects level (NOAEL)", "Lowest observed adverse effect level (LOAEL)", "Maximum tolerated dose (MTD)" tra le più comuni. Tra le diverse opzioni l'utilizzo della NOAEL vede i favori sia dei tossicologi che delle autorità regolatorie. Il riconoscimento e l'utilizzo della NOAEL viene riportato nelle ICH S6 e recentemente ne è stato codificato l'uso per la selezione della prima dose nell'uomo da una recente linea guida della FDA. Tuttavia esistono delle limitazioni intrinseche nell'uso della NOAEL che devono essere riconosciute sia per i fini valutativi stessi sia per selezionare metriche di giudizio tossicologico alternative. Tra le limitazioni più importanti va riconosciuto il fatto che la NOAEL è dipendente dalla selezione della dose, dalle dimensioni del campione, che raramente riesce a valutare la ripidità della curva dose risposta e che spesso non è consistente quando confrontata attraverso diversi studi o endpoints misurati. Di interesse è inoltre il fatto che la NOAEL è generalmente considerata una soglia, ma diversi autori hanno dimostrato come questo non sia vero e che il range di variabilità vada dal 5 al 20%. Tali considerazioni suggeriscono che l'uso della NOAEL può non essere appropriato e che metodi alternativi quali il calcolo della "Benchmark dose" possono concorrere favorevolmente nella caratterizzazione del rischio. Alcuni esempi vengono presentati e discussi.

VALUTAZIONE PRECLINICA DEI RADIOFARMACI: CONSIDERAZIONI E PROPOSTE SULLA DRAFT GUIDANCE FDA

Bussi S., Morisetti A.

Bracco Imaging SpA, Centro Ricerche, Pharmatox Development, Milano

Recentemente l'FDA ha pubblicato un draft "Guidance for Industry" per la valutazione preclinica della tossicità tardiva indotta dai radiofarmaci. In alcuni studi clinici è stato infatti evidenziato il rischio di effetti tossici irreversibili a livello renale successivi all'esposizione a radiofarmaci per la terapia antineoplastica. Poiché il danno renale è apparso circa 3 mesi dopo la somministrazione la richiesta FDA di effettuare studi preclinici di sicurezza con maggiore estensione temporale e finalizzata all'identificazione degli organi bersaglio appare giustificata in vista della tutela della safety del paziente. Esistono tuttavia aspetti metodologici che incidono pesantemente sia sui tempi di realizzazione (la durata di questi studi è di almeno un anno) sia sull'aspetto economico (uso del radioattivo e quindi disponibilità delle strutture dedicate, selezione della specie animale, cinque livelli di dosaggio, dosi singole e/o ripetute a seconda dell'impiego clinico). L'FDA, inoltre, raccomanda di completare tali studi prima dell'inizio della Fase II. Considerando tutte le attività sperimentali, dalla programmazione alla stesura della relazione finale, il tempo necessario per concludere tali studi potrebbe salire a 18-24 mesi, incidendo notevolmente sui piani di sviluppo e ritardando l'immissione sul mercato. A parte ogni considerazione economica, si pensi all'aspetto etico di ritardare la disponibilità di terapie che possano almeno prolungare la sopravvivenza e/o migliorare la qualità della vita dei pazienti. Se la guidance deve fornire endpoints di safety, il disegno sperimentale deve basarsi sulle caratteristiche peculiari del radiofarmaco e gli studi preclinici di sicurezza non possono non tener conto delle prime esperienze sul paziente. I dati di cinetica e dosimetria ottenuti in Fase I hanno il compito di evidenziare similitudini e differenze tra animale da laboratorio e uomo, indirizzando così il disegno sperimentale preclinico in maniera appropriata e specifica per ogni farmaco. Si è pertanto proposto, ferme restando le garanzie sui requisiti di sicurezza in Fase I, di condurre tali studi preclinici in parallelo agli studi clinici di Fase II.

SAFETY ASSESSMENT DI MATERIALI E OGGETTI IN CONTATTO CON GLI ALIMENTI: SISTEMA ITALIANO E EUROPEO, STATO DELL'ARTE E NUOVE TENDENZE

Milana M.R.

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,
Roma*

I materiali e oggetti in contatto con alimenti sono sotto il controllo delle norme sanitarie italiane ed europee fin dagli anni '70. È infatti noto che i materiali possono interagire con gli alimenti con cui sono posti a contatto (contenitori, pentolame, macchinari, involucri ect.) rilasciando sostanze che possono essere ingerite assieme all'alimento stesso. È necessario quindi valutare se i livelli di tali contaminanti "involontari" degli elementi costituiscono un rischio per i consumatori. In tale ambito esistono sistemi di valutazione sia a livello italiano che europeo. Tali sistemi sono in continua evoluzione in conseguenza del progresso tecnico-scientifico sia in campo industriale (sviluppo di nuovi materiali e nuovi sistemi) sia in campo tossicologico (nuova evidenza scientifica su aspetti tossicologici). La presentazione ha lo scopo di illustrare i sistemi esistenti, evidenziandone i punti chiave; verrà dato particolare rilievo alle interazioni fra la valutazione tossicologica di base, i consumi alimentari e il quadro di esposizione dei consumatori. Verranno evidenziate infine le tendenze emergenti e le possibili evoluzioni dei sistemi valutativi.

Sesta Sessione Aula Bovet
TOSSICOLOGIA CLINICA:
INTOSSICAZIONI ACUTE E CENTRI ANTIVELENI

Moderatori:

A. Filippelli, L. Manzo

ARRESTO CARDIACO DA INTOSSICAZIONE ACUTA DA OLEANDRO: TRATTAMENTO CON PACE MAKER ESTERNO COME PONTE ALLA TERAPIA ANTIDOTICA CON FAB

Severgnini P.¹, Lanza C.¹, Rovera F.², Perlasca F.³, Travaglia A.⁴, Davanzo F.⁴

¹Centro Terapia Intensiva, Unità Operativa Anestesia e Rianimazione B, Università degli Studi dell'Insubria, Azienda Ospedaliera Fondazione Macchi, Varese; ²Clinica Chirurgica, Università degli Studi dell'Insubria, Azienda Ospedaliera Fondazione Macchi, Varese; ³Unità Operativa di Pronto Soccorso e Accettazione, Azienda Ospedaliera Fondazione Macchi, Varese; ⁴Centro Antiveneni, Azienda Ospedaliera, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Una donna di 65 anni, farmacista, si presenta al Pronto Soccorso dell'ospedale di Varese un'ora e quaranta minuti dopo aver ingerito, a scopo suicida, due foglie di Oleandro (Oleander Nirium). Obbiettivamente presenta: malessere generale, nausea e vomito, viene sottoposta subito a lavanda gastrica e gli viene somministrato carbone attivato. In Pronto Soccorso, la paziente ha un primo arresto cardiaco in asistolia, trattato efficacemente con massaggio cardiaco esterno, isoprotenerolo 0,2mg e.v. e intubazione orotracheale. Trentacinque minuti dopo si osserva un secondo episodio di asistolia cardiaca trattato per mezzo di un pacing transcutaneo. Il controllo elettrocardiografico evidenzia un blocco atrio-ventricolare di primo grado caratterizzato da un P-Q lungo. La cardiotossicità dell'oleandro è ben documentata ed è dovuta alla presenza di sostanze digossino-simili quali oleandrina, oleandroside, nerioside e digossigenina, e per ciò è stato eseguito in accordo con il Centro Antiveneni di Milano il dosaggio della digossinemia² e nonostante questo sia risultato all'interno del range di normalità (1,4ng/ml), vista la gravità del quadro cardiocircolatorio, si è proceduto alla richiesta degli anticorpi specifici anti-digitale al Centro antiveneni di Milano ed è stato possibile somministrarli due ore e venti minuti dopo l'episodio di arresto di circolo. In attesa dell'antidoto, il supporto circolatorio è stato garantito dall'impianto di un pace maker temporaneo transvenoso, (soglia 0,6, frequenza 70 bpm e output 4 mA), in sostituzione di quello transcutaneo. Dopo l'infusione di 200mg in 30 minuti di anticorpi specifici anti-Digossina la paziente è stata ricoverata in Unita Coronaria e al controllo dopo 24 ore il livello della digossinemia era ridotto (0,8ng/ml). La paziente è stata monitorata per 3 giorni e poi trasferita in un centro psichiatrico. a un anno dall'evento la paziente sta bene ed è ancora in cura domiciliare psichiatrica per i suoi problemi di depressione. In caso di intossicazione da oleandro, questo caso clinico insegna al medico d'emergenza che la presenza di una severa aritmia cardiaca deve essere considerata con un livello di valore diagnostico superiore rispetto al dosaggio di digossinemia, che scarsamente correla con il livello di intossicazione; come a dire che i sintomi e i segni sono più importanti nel guidare la terapia. Un ulteriore insegnamento riguarda l'impiego immediato di pace maker esterni, che anche in caso di lunga attesa per procurarsi l'antidoto, può comunque risultare un trattamento salvavita, stabilizzando il ritmo cardiaco e ripristinando la circolazione.

INGESTIONE ACCIDENTALE DI LEVOTIROXINA IN ETÀ PEDIATRICA

Dimasi V., Della Puppa T., Manfrè S., Davanzo F.
Centro Antiveleni, Azienda Ospedaliera, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Introduzione. La levotiroxina sodica è l'ormone tiroideo più spesso impiegato nella terapia sostitutiva dei casi di ipotiroidismo. Dalla letteratura si rileva come le possibili gravi complicazioni, osservabili in sovradosaggio, non siano dovuti a livelli plasmatici elevati di T4, piuttosto che alla presenza di alte concentrazioni di T3 nei tessuti. La tossicità acuta, dopo ingestione di levotiroxina, è influenzata dalla dose ingerita, dal tempo di conversione del T4 in T3 (generalmente da 48 a 72 ore) e dal tempestivo intervento terapeutico per evitare l'assorbimento del farmaco.

Casistica e risultati. Sono stati analizzati i casi di consulenza telefonica pervenuti al Centro Antiveleni di Milano e i relativi follow-up, per la durata di un anno, che riguardavano 48 pazienti in età pediatrica. Le richieste sono giunte al CAV di Milano o per contatto diretto della madre o tramite il pediatra del Pronto Soccorso al quale il paziente afferiva. L'età dei bambini era compresa fra 1 e 5 anni. Quattro casi hanno presentato sintomi (tachicardia, agitazione e vomito) nelle prime 8 ore dall'arrivo in ospedale, gli altri 44 pazienti si sono mantenuti asintomatici. Per tutti i pazienti veniva richiesto un dosaggio basale di FT3, FT4 e TSH al tempo 0 in Pronto Soccorso, e un controllo degli stessi parametri dopo 7-10 giorni. Il follow-up, eseguito a distanza di 7-10 giorni dall'evento, ha evidenziato la presenza di sintomi in un solo caso. Tale paziente, già in terapia con Eutirox, aveva ingerito 8 compresse da 100 mcg. La sintomatologia acuta comprendeva tachicardia alla quale si erano aggiunti, dopo una settimana, febbre, vomito e diarrea. I dosaggi del laboratorio di riferimento, mostravano, rispetto al basale, una diminuzione del FT3 da 2,45 pg/mL a 1,25 pg/mL (v.n. 0,60-1,80 pg/mL) e dell'FT4 pg/mL da 14,6 a 11,9 (v.n. 4,5-10,9 pg/mL). Il TSH si manteneva immutato. Dei restanti 47 pazienti, 31 erano asintomatici mentre non si sono potute ottenere informazioni relative agli altri 16.

Conclusioni. Nella casistica analizzata per una ingestione al di sotto di 100 mcg di levotiroxina non sono stati evidenziati segni e sintomi degni di nota, né al tempo 0 né al follow up eseguito a distanza di 7-10 giorni dall'evento. Da queste osservazioni si può concludere che tale sovradosaggio accidentale di ormone tiroideo, in accordo con i dati della letteratura, non rappresenta una emergenza tossicologica di particolare gravità.

INTOSSICAZIONE DA CARBAMAZEPINA: DUE CASI CLINICI CON DIVERSA EVOLUZIONE

Lepore A.J.
Ospedali Riuniti di Foggia

Obiettivi: La carbamazepina è derivata dalla imminostilbenzene, con un gruppo carbossilico in posizione 5. Si lega alle proteine plasmatiche per l'80%. Il picco plasmatico si ha in 2-6 h. La biotrasformazione porta alla formazione di diversi metaboliti di cui uno, l'epossido è attivo come la sostanza originaria. Descriviamo due casi clinici a scopo autolesivo. Primo caso: Donna di a.a. 43 in terapia abituale con antidepressivi, antipsicotici, carbamazepina. Ricovero per ingestione imprecisata di carbamazepina. Presentava sonnolenza, incoordinazione motoria, ipossiemia all'E.A.B., alterazione della ripolarizzazione miocardica ventricolare all'ECG, non alterazioni pleuroparenchimali all'Rx torace, ipopotassiemia, ipocloremia, dosaggio carbamazepina 14,1 mcgr/ml. Il giorno seguente il dosaggio di carbamazepina si eleva a 20,5 mcgr/ml. In terza giornata il dosaggio scende a 6,4 mcgr/ml. In quarta giornata abbiamo 3,5 mcgr/ml. Tali dosaggi venivano effettuati ogni 6 h. La condotta terapeutica è stata effettuata con ossigenoterapia, carbone vegetale, lavaggio intestinale, soluzioni ripolarizzanti. Monitoraggio continuo dei parametri vitali. Dimessa in quarta giornata. Controllo ambulatoriale a distanza di 7 giorni con dosaggio di carbamazepina. Secondo caso: Donna di 48 a.a. Terapia abituale con antidepressivi. Ingestione in quantità imprecisata di carbamazepina. Presenta stato di coma lieve, atassia, tachicardia, sovraccarico ventricolare sx e turbe diffuse della ripolarizzazione ventricolare, VES 26 mm/h, ipopotassiemia, iperfosforemia, Rx torace negativo, dosaggio carbamazepina all'ingresso di 20 mcgr/ml, Hb 12,2 g/dl, PLT 255. Veniva praticata la seguente terapia: lavaggio intestinale, dosi multiple di carbone vegetale, ossigeno terapia in maschera, ripolarizzanti. Monitoraggio parametri emodinamici. A distanza di 6 h dal ricovero, il dosaggio della carbamazepina spiccava a 60 mcgr/ml e l'E.A.B. mostrava acidosi metabolica, l'Hb diminuiva a 9,8 e si rilevava piastrinopenia a 96, per cui si provvedeva immediatamente a seduta di emoperfusione su colonna di carbone e a correzione dell'acidosi metabolica. Lo stato di coma peggiorava per cui si provvedeva alla intubazione orotracheale e a ventilazione meccanica, previa analgesedazione. A distanza di 6h dall'emoperfusione, il dosaggio della carbamazepina era di 50 mcgr/ml, per cui si procedeva a nuove sedute di emoperfusione, l'Hb era 8,9, ipoplastrinemia di 80. Dopo 3h, la paziente presentava grave aritmia ventricolare con allungamento del Q-T che sfociava in Fibrillazione ventricolare. Si praticavano manovre e terapia rianimatorie senza successo. Da ciò si evince che i due parametri laboratoristici iniziali erano simili inizialmente, l'assunzione imprecisata per entrambe, e terapia iniziale simile nei due casi. Sintomatologia differente. Il trattamento dell'emoperfusione deve essere eseguito sulla base dei dati laboratoristici o sulla base della sintomatologia?

UN CASO RARO D'INTOSSICAZIONE DIGITALICA PER VIA ENDOVENOSA

Pignataro A.¹, Georgatos J.², Locatelli C.²

¹Unità Operativa Centrale di Anestesia e Rianimazione, Ospedale Buccheri La Ferla FBF, Palermo; ²Centro Antiveneni e Centro Nazionale Informazione Tossicologica, IRCCS, Fondazione Maugeri e Università degli Studi di Pavia

Introduzione: l'intossicazione digitalica è tra le più comuni e gravi reazioni avverse da farmaci. Raramente, i farmaci contenenti digitale vengono assunti a scopo autolesivo. In questo caso clinico descriviamo un tentativo di suicidio per iniezione endovenosa di digitale. *Caso clinico:* alle ore 1.30 una donna di 47 anni era condotta al pronto soccorso dall'ambulanza del 118 in seguito ad auto-somministrazione endovenosa di 10 fiale di digossina (5 mg) a scopo autolesivo, avvenuta tre ore prima. La donna, di professione medico, era affetta da sindrome depressiva non trattata. All'esame obiettivo, la donna lamentava nausea e presentava polipnea e tachicardia. Ricoverata in reparto di cure intensive per monitoraggio emodinamico continuo (ritmo cardiaco, pressione arteriosa per via cruenta), la paziente mostrava buone condizioni di compenso; l'elettrocardiogramma rilevava un ritmo sinusale a frequenza di 110 battiti/minuto. La digossinemia a 3 ore dall'iniezione endovenosa era 4,5 ng/ml (v.n. 0,5 – 2,0), l'emogasanalisi mostrava alcalosi metabolica per ipocapnia (pH 7,56, pCO₂ 21 mmHg) e la potassiemia era di 4,5 mEq/l. Veniva intrapresa terapia infusoria (soluzione glucosata al 5%, insulina pronta) e diuretica: dopo consulenza con un centro antiveneni fu concordata la somministrazione di frammenti anticorpali antidigitale. Questo antidoto, indisponibile nel nostro ospedale, venne reperito presso un ospedale di una città vicina utilizzando una banca nazionale degli antidoti disponibile via internet (1). L'attivazione di una staffetta del servizio territoriale 118 (elicottero +ambulanza) permetteva di recapitare il Digibind® (4 fiale) presso il nostro reparto circa quattro ore dopo il ricovero della paziente. Alle ore 3.45 il monitoraggio cardiaco continuo evidenziava tachicardia sinusale (frequenza cardiaca 130 battiti/minuto) ed episodi di blocco atrio-ventricolare 2:1 con pressione arteriosa stabile. La digossinemia, al secondo prelievo (ore 4.00), era 4,3 ng/ml, la potassiemia 3,8 mEq/l. Alle ore 5 venivano somministrati 4 fiale di digibind® (152 mg) in infusione endovenosa (2). Il tracciato elettrocardiografico si normalizzava dopo 1 ora dalla somministrazione dell'antidoto ma comparivano quadri di blocco atrio-ventricolare di I grado risolti in seguito. Il potassio e gli altri elettroliti plasmatici restavano nella norma fino alla dimissione della paziente. La digossinemia 36 ore dopo il ricovero era 1,7 ng/ml. Dopo una consulenza psichiatrica, la paziente veniva dimessa in buone condizioni generali in 3° giornata.

Discussione: l'iniezione endovenosa di digossina rappresenta un evento eccezionale di autolesionismo, in genere limitata al personale sanitario. I frammenti anticorpali antidigitale, quando non disponibili in ospedale, possono essere reperiti attraverso la consultazione online gratuita di una database nazionale degli antidoti.

(http://anestit.unipa.it/esiait/0298_01.htm)

VITAMINA K, ERRORI..... TERAPEUTICI

Faraoni L., Bacis G., Farina M.L.
Centro Antiveleni, Ospedali Riuniti, Bergamo

Introduzione. Diversi schemi terapeutici sono stati proposti per la prevenzione della malattia emorragica del neonato. L'American Academy of Pediatrics raccomanda la somministrazione di un'unica dose (0,5-1 mg) intramuscolo. Uno studio Danese del 2003 ritiene efficace lo schema terapeutico di una somministrazione settimanale per via orale. In Italia, si è evidenziato un problema di non corretta somministrazione a causa del frequente errore di scambio tra un prodotto a base di fitomenadione (20mg/ml) e un integratore a base di vitamina k (20 mcg/ml), tale da indurre l'agenzia Italiana del Farmaco a emanare una nota informativa.

Case report. Dal Settembre 2004, al settembre 2005 il Centro Antiveleni di Bergamo è stato contattato per 10 casi, di somministrazione incongrua di vitamina K, a seguito dello scambio tra un preparato a bassa concentrazione (25 mcg/ml) con uno ad alta concentrazione (20 mg/ml). L'età dei bambini variava dai 3 giorni ai 3 mesi. La somministrazione in 4 casi è stata un'unica, in 5 casi il trattamento è stato prolungato (range: 2 giorni, tre mese). La dose di vitamina k somministrata è compresa tra i 10 mg, al posto di 10 mcg, fino a 3600 mg, al posto di 3600 mcg. 9 pazienti su dieci non hanno avuto sintomi. In un solo caso, la mamma ha riferito un aumento delle coliche addominali, che si sono attenuate alla sospensione del farmaco.

Conclusioni. In accordo con i dati delle letterature non abbiamo evidenziato dei rischi tossicologici nel sovra dosaggio di vitamina k. È tuttavia importante richiamare l'attenzione su alcuni aspetti: L'errore terapeutico, che si è generato con l'immissione in commercio di un prodotto parafarmaceutico dal nome "confondente". L'assenza di vantaggi documentati rispetto alla precedente formulazione e rispetto allo schema terapeutico. Una posologia più complessa (1 gtt settimanale vs 20 gtt die). Infine ma non per questo meno importante l'aumento dei costi per le famiglie. Nel primo il costo a carico delle famiglie è di circa 1, 24 € contro gli 84 € del secondo caso.

REAZIONE AVVERSA GRAVE DA EPARINE: CASO CLINICO

Mattioli F.¹, Storace S.², Martelli A.¹

¹Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Clinica, Università degli Studi di Genova; ²Medico di Medicina Generale

Caratteristiche del paziente: uomo, anni 58, diabetico e con familiarità nota al rischio embolico, portatore di mutazione G20210A del gene della protrombina e di polimorfismo C677T per il gene MTHFR (polimorfismo omozigote) per iperomocisteinemia.

Evento: L'uomo, autista di pullman turistici, si frattura il malleolo a Praga; ligio al dovere riconduce l'autobus in Italia dove finalmente (tempo 4-6 ore) viene sostituito e ingessato. Viene quindi subito dimesso con indicazione di profilassi eparinica; la prima somministrazione di eparina calcica, effettuata non appena a casa, induce dolori trafittivi intensi, ma transitori. Il giorno successivo, dopo acquisto del farmaco prescritto all'Ospedale, la somministrazione di parnaparina sodica scatena dolori molto intensi localizzati soprattutto agli arti inferiori, la terza somministrazione deve essere interrotta per dolore intollerabile che induce immediatamente nausea e vomito e successivamente obnubilamento del sensorio protrattosi per 48 ore. Dal terzo giorno recupero progressivo della lucidità mentale, ma spossatezza estrema risoltasi dopo vari giorni.

Ipotesi: La mutazione G20210A riguarda il gene della protrombina e si associa a un aumentato livello dell'enzima, è la seconda causa più comune di ipercoagulabilità, ha incidenza del 2-3% nei caucasici. Si associa a manifestazione trombotiche le cui manifestazioni più frequenti sono l'eritromelalgia e le trombosi microvascolari. Si ipotizza che nel paziente la concomitante iperomocisteinemia o forse la semplice frattura non trattata tempestivamente abbiano indotto una reazione di microtrombosi, localizzata soprattutto agli arti inferiori con comparsa di eritromelalgia (polineuropatia assonale) evidentemente molto dolorosa.

Conclusioni: le alterazioni genetiche riferite non si associano ad attivazione della trombina, pertanto nel caso citato si può forse ipotizzare un'attivazione piastrinica associata a danno endoteliale. È stato consigliato trattamento con aspirina a basse dosi che il paziente tollera benissimo e che è tuttora in atto a distanza di 1 anno.

INTOSSICAZIONE ACUTA DA OLANZAPINA IN PAZIENTI SCHIZOFRENICI

Bugamelli F.¹, Saracino M.A.¹, Mandrioli R.¹, Petio C.², Koukopoulos A.³, Raggi M.A.¹

¹Laboratorio di Analisi Farmaco-Tossicologica, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna; ²Clinica Psichiatrica Ottonello, Ospedale Maggiore, Bologna; ³Centro Lucio Bini, Roma

L'Olanzapina (2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tienobenzodiazepina) è un farmaco antipsicotico atipico utilizzato per il trattamento dei sintomi positivi e negativi della schizofrenia. È dotata di un ampio profilo farmacologico su numerosi sistemi recettoriali: ha un'alta affinità per i recettori dopaminergici (D1-D5), serotoninergici (5HT2-5HT6), adrenergici (alfa1), istaminergici (H1) e colinergici di tipo muscarinico. Rispetto agli antipsicotici classici (Clorpromazina, Aloperidolo) produce minori effetti extrapiramidali e minor iperprolattinemia; pur essendo un farmaco più sicuro, può causare aumento ponderale, ipotensione arteriosa, sedazione, nervosismo ed effetti anticolinergici. Non è, quindi, esente da effetti tossici, soprattutto in caso di overdose. I sintomi in un'intossicazione acuta accidentale o volontaria da Olanzapina sono rappresentati da un'esasperazione degli effetti farmacologici del farmaco. La tossicità è variabilmente caratterizzata da depressione respiratoria, miosi o midriasi, ipertensione o ipotensione ortostatica, delirio e aritmie atriali o ventricolari; a livello del Sistema Nervoso Centrale si possono avere atassia, letargia, amnesia retrograda e anterograda, coma. Sebbene la patofisiologia della sovrassunzione sia ancora sconosciuta, si pensa che il meccanismo tossico-letale sia da imputare a una cardiotoxicità a livello della membrana cellulare e che una concomitante patologia cardiovascolare sia necessaria per portare al decesso un individuo in seguito a un'overdose di Olanzapina. I livelli plasmatici terapeutici dell'Olanzapina sono compresi in un range di 8-50 ng/mL, in seguito all'assunzione di una dose giornaliera di farmaco compresa tra 5 e 20 mg. È stata riferita la potenziale tossicità del farmaco già a un valore di concentrazione plasmatica pari a 100 ng/mL, anche se risulta difficile stabilire una correlazione tra overdose e concentrazione plasmatica dell'Olanzapina. In ogni caso, la dose tossica è altamente variabile e dipende largamente dalla presenza di cointossicazioni, età e abitudini del paziente, dal tempo intercorso tra l'assunzione e l'inizio del trattamento. Negli ultimi tempi ci siamo occupati di tre casi di overdose in cui i pazienti avevano assunto, a scopo autolesivo, una o più scatole di Zyprexa (più di 140 mg di Olanzapina). I pazienti erano stati ricoverati al Pronto Soccorso con gravi sintomi quali coma, amnesia o stato confusionale. Dopo lavanda gastrica, i campioni di plasma prelevati sono stati inviati al nostro laboratorio di Analisi Farmaco - Tossicologica e analizzati. I valori di Olanzapina trovati erano vicini o superiori a 100 ng/mL. A tal fine è stato utilizzato un metodo analitico messo a punto nel nostro laboratorio, basato sull'uso di un HPLC con detector coulombometrico, dotato di alta sensibilità e selettività.

STUDIO OSSERVAZIONALE SUGLI EVENTI AVVERSI IN PRONTO SOCCORSO DELLA REGIONE CAMPANIA

Capuano A., Mazzeo F., Avolio A., Ferrante L., Gallo M., Illiano M., Capuano M., Filippelli A., Rossi F.

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Farmacologia L. Donatelli, Facoltà di Medicina e Chirurgia, SUN, Napoli

Scopo di tale studio, condotto in dieci ospedali della Regione Campania è stato quello di valutare: 1) il numero di accessi al PS dovuti a reazioni avverse a farmaci (RAF); 2) la percentuale di ricoveri ospedalieri dovuta a RAF; 3) le classi farmacologiche responsabili di RAF; 4) il tipo di RAF e la loro frequenza.

Materiali e metodi: Il progetto, che prevedeva la rilevazione prospettica di tutti gli accessi in pronto soccorso, è stato condotto in due periodi di durata di dieci giorni l'uno e a distanza di tre mesi l'uno dall'altro. a ogni PS sono stati assegnati 2 o più *monitors* per ogni fascia oraria di rilevamento. Per ogni paziente, previo consenso informato, il *monitor* procedeva alla raccolta dei dati attraverso una apposita scheda. Quando il paziente veniva trasferito in un altro reparto per ulteriori indagini, il medico del PS riferiva al *monitor* le notizie richieste nella scheda. Riportiamo qui di seguito i risultati preliminari relativi al monitoraggio degli accessi al Pronto Soccorso (PS) dell'Azienda Ospedaliera A. Cardarelli, dell'Ospedale S.M. degl'Incurabili e dell'Ospedale Pellegrini.

Risultati: Dei 3224 accessi presso i PS degli ospedali monitorati, 30 (0,9%) erano correlati a farmaci. Dei 480 ricoveri, 17 (3,6%) erano dovuti a reazioni avverse a farmaci. L'incidenza dei ricoveri, per eventi avversi a farmaci, aumentava notevolmente (7,8%) se si consideravano i pazienti (382) che avevano assunto farmaci nelle due settimane precedenti il ricovero. Le classi di farmaci maggiormente responsabili di eventi avversi sono state: antinfiammatori (26,5%), antibiotici (23,6%) e gli antipertensivi (17,7%). Gli eventi indesiderati maggiormente osservati sono stati: disturbi gastrointestinali (diarrea, vomito ed emorragie gastriche), disturbi neurologici (confusione e vertigini) e rash cutanei (eritema e dermatiti).

Conclusioni: L'incidenza di probabili eventi avversi è risultata abbastanza elevata rapportata al breve periodo di osservazione e ciò evidenzia anche il problema relativo alla spesa dovuta a tali ospedalizzazioni. Unitamente a ciò, si è notato che tra i farmaci maggiormente implicati negli accessi al PS ci sono stati gli antibiotici, classi di farmaci che talora vengono utilizzati in maniera indiscriminata e per le quali occorre che vi sia sempre un'attenta sorveglianza sanitaria.

ASPETTI REGISTRATIVI E IMPIEGO CLINICO DEGLI ANTIDOTI: ANALISI DELLA SITUAZIONE ITALIANA

Butera R., Locatelli C., Petrolini V., Lonati D., Manzo L.
*Servizio di Tossicologia, Centro Antiveleeni di Pavia, Centro Nazionale di Informazione
Tossicologica, IRCCS, Fondazione Maugeri e Università degli Studi di Pavia*

Introduzione. Gli antidoti sono a tutti gli effetti farmaci, ai quali vengono oggi richieste prove di efficacia e sicurezza per il loro corretto impiego nella terapia delle patologie umane. Alcuni antidoti vengono comunemente usati nella pratica clinica e i loro effetti terapeutici e collaterali sono ampiamente conosciuti. Altri sono invece di raro utilizzo, e la loro esistenza e disponibilità è spesso misconosciuta, nonostante costituiscano veri e propri farmaci salvavita.

Obiettivo. Analizzare lo status registrativo degli antidoti in Italia.

Materiali e metodi. È stata effettuata una revisione di tutte le molecole proposte negli ultimi decenni per il trattamento delle intossicazioni acute (antidoti riportati in fonti rilevanti dal punto di vista normativo e scientifico, elenco dei medicinali in commercio in Italia). La revisione dei testi di riferimento in ambito tossicologico e della letteratura biomedica più recente ha consentito di distinguere (i) gli antidoti utilizzati nella pratica clinica e (ii) le molecole proposte per uso antidotico ma attualmente non utilizzate come antidoti nel trattamento delle intossicazioni acute. Non sono stati considerati tra gli antidoti i farmaci di uso sintomatico.

Risultati. Sono state identificate 149 molecole utilizzate in tossicologia clinica e/o proposte per l'uso antidotico. Nei documenti tecnico-scientifici sono stati identificati 122 antidoti. Di questi, 64 molecole sono utilizzate attualmente nella pratica clinica; 58 molecole invece - allo stato attuale delle conoscenze - risultano antidoti obsoleti o farmaci di normale utilizzo come sintomatici. La consultazione degli elenchi ufficiali ha consentito di identificare 67 principi attivi con ATC e/o con indicazioni terapeutiche registrate riferibili all'uso antidotico. Di queste, 28 sono utilizzate nella pratica clinica; le rimanenti 39 molecole non trovano impiego per il trattamento delle intossicazioni acute, quando anche registrate per questa indicazione. Analizzando invece i 64 antidoti di corrente impiego clinico, emerge che solo 14 sono disponibili in Italia come specialità medicinali registrate per l'uso antidotico, e tra queste solo per 5 il foglietto illustrativo riporta indicazioni terapeutiche complete e posologia corretta per l'impiego antidotico.

Discussione. L'uso off-label degli antidoti rappresenta una necessità, stante la situazione registrativa appena descritta. Questa non può essere completamente ascritta alla mancanza di prove di efficacia degli antidoti di raro impiego, dal momento che risultano registrati per l'uso antidotico anche farmaci per i quali l'unico elemento a supporto dell'impiego in tossicologia clinica è rappresentato dalla plausibilità biochimica, in assenza di prove cliniche convincenti o perlomeno suggestive.

VERSO UN PIANO NAZIONALE PER LA SORVEGLIANZA DELLE INTOSSICAZIONI ACUTE

Settimi L.¹, Davanzo F.², Sodano L.³, Vellucci L.³

¹Centro Nazionale di Epidemiologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Centro Antiveleni di Milano, Azienda Ospedaliera, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano; ³Ministero della Salute, Roma

I centri antiveleni (CAV) attivi in Italia ricevono ogni anno circa 67.000 richieste di consulenza per presunte intossicazioni. Le principali categorie di agenti associati a questi incidenti comprendono farmaci (circa il 43% dei casi), prodotti domestici (circa il 23% dei casi), prodotti industriali, antiparassitari, alimenti/vegetali (ciascuna categoria riferita a circa il 5% dei casi), cosmetici e prodotti per l'igiene personale (circa il 4% dei casi). Le esposizioni risultano verificarsi per circa l'87% dei casi in ambiente domestico e una parte rilevante dei soggetti intossicati risulta essere costituita da bambini con età inferiore a cinque anni, i quali rappresentano circa il 44% dell'intera casistica. Come evidenziato dall'attività svolta negli Stati Uniti a partire dai primi anni '80, la sorveglianza epidemiologica di questi eventi può costituire una importante base informativa per identificare agenti particolarmente pericolosi, fornire indicazioni per la riformulazione, il confezionamento o la revoca di prodotti commerciali, indirizzare interventi di prevenzione e valutarne le ricadute, identificare e documentare incidenti chimici di varia natura, indirizzare attività di ricerca e fornire supporto per interventi normativi. In considerazione di questi aspetti, il Centro per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute ha promosso l'implementazione di un sistema di sorveglianza nazionale delle intossicazioni acute, basato sul contributo dei CAV e coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità. I presupposti essenziali per la realizzazione di questa iniziativa sono costituiti dall'adozione da parte dei Centri collaboranti di un set minimo di dati di rilevazione comune e dall'applicazione di criteri standard condivisi per la valutazione e la classificazione dei casi esaminati. Altro aspetto considerato, è la messa a punto di un sistema per la rilevazione e gestione dei dati accessibile in rete. Si prevede che l'analisi integrata dei dati provenienti dai diversi CAV sia in grado di fornire una base conoscitiva di rilevante interesse per la caratterizzazione e per l'approfondimento di varie tematiche di rilevanza sanitaria quali, a esempio, gli incidenti domestici, le intossicazioni da farmaci, le intossicazioni nei bambini, gli incidenti occupazionali e ambientali, le intossicazioni alimentari e le intossicazioni da sostanze di abuso. Una particolare attenzione viene attualmente rivolta al contributo che potrà derivare dal sistema di sorveglianza per la tempestiva identificazione e caratterizzazione di eventuali atti terroristici di tipo chimico. Al fine di rispondere a questa esigenza specifica, è in corso di definizione un elenco di sindromi tipiche, potenzialmente riferibili ad agenti utilizzabili per scopi terroristici, le quali verranno sottoposte a monitoraggio in continuo nell'ambito del sistema proposto.

Poster Aula Pocchiari

7 FEBBRAIO 2006

P1. ANALISI BIOCHIMICA SUL TESTICOLO E SUL GASTROCNEMIO DI TOPI NUTRITI CON SOIA GENETICAMENTE MODIFICATA

Boschi F.¹, Verri M.¹, Biggiogera M.², Dossena M.¹, Pastoris O.¹

¹Dipartimento di Scienze Fisiologiche-Farmacologiche, Università degli Studi di Pavia;

²Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Pavia

Esiste una diffusa inquietudine sull'impatto dei cibi geneticamente modificati (GM) o dei loro derivati sulla salute umana e animale. *Scopo* Questo studio si pone l'obiettivo di analizzare alcuni dei possibili problemi correlati con l'utilizzo dei prodotti alimentari GM quantificando, in particolar modo, gli effetti della soia GM sul metabolismo cellulare. A tal proposito è stata condotta un'analisi biochimica sul testicolo e sul muscolo gastrocnemio di topo, tessuti che sono riconosciuti essere bersaglio o particolarmente sensibili a possibili modificazioni o danni dovuti alla dieta.

Materiali e metodi Venti topoline gravide hanno ricevuto una dieta contenente: soia GM (14%), frumento, granturco, orzo, erba medica, latte in polvere e sali minerali. In parallelo, venti topoline di controllo sono state nutrite con una dieta identica, ma contenente soia non GM. La progenie è stata nutrita con le stesse diete per periodi diversi. Venti topi maschi della progenie (dieci dal gruppo GM e dieci dal gruppo di controllo) sono stati sacrificati a diversi intervalli di tempo (2, 5 e 8 mesi) e sono stati prelevati i testicoli e il gastrocnemio. È stata valutata l'attività specifica (espressa in nmol/min/mg di proteina) di alcuni enzimi chiave della glicolisi (piruvato chinasi e lattato deidrogenasi), del ciclo di Krebs (citrato sintasi) e della catena di trasferimento elettronico mitocondriale (NADH-ubichinone ossidoreduttasi, succinato deidrogenasi, citocromo c reductasi rotenone insensibile, citocromo ossidasi).

Risultati Topi nutriti con soia GM per 2 e 5 mesi hanno mostrato un metabolismo aerobico ridotto che mostra un recupero nei topi trattati e sacrificati all'ottavo mese, sia a livello del testicolo che del gastrocnemio. Le analisi morfologica e istochimica hanno evidenziato una differenza a livello della presenza di fattori di splicing nel confronto tra tessuti prelevati da topi controllo e topi trattati con soia GM; il calo trascrizionale e maturativo (prevalentemente a carico del pre-mRNA) viene poi recuperato all'ottavo mese.

Conclusione Dai risultati si può evincere che l'effetto della dieta GM sembra essere reversibile e si accompagna a un rallentamento metabolico dei tessuti analizzati che è in seguito recuperato.

P2. DETERMINAZIONE DELLA VITELLOGENINA DI SPIGOLA CON METODI IMMUNOENZIMATICI E BIOSENSORE OTTICO

Bulukin E.¹, Meucci V.², Minunni M.¹, Pretti C.³, Intorre L.², Soldani G.², Mascini M.¹

¹Dipartimento di Chimica, Polo Scientifico, Università degli Studi di Firenze, Sesto Fiorentino, Firenze; ²Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Pisa; ³Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti Università degli Studi di Pisa

I distruttori o interferenti endocrini (EDs) sono composti capaci di indurre modificazioni della funzione riproduttiva di vertebrati ovipari. Alcuni EDs possono legare con alta affinità il recettore per gli estrogeni come agonisti iniziando i processi cellulari tipici degli estrogeni naturali o possono legare il recettore come antagonisti bloccando così i siti di legame per gli estrogeni endogeni. L'esposizione di pesci a estrogeni o antiestrogeni ambientali può essere valutata attraverso la misurazione della vitellogenina (VTG), una fosfoglicoproteina precursore delle proteine del tuorlo dell'uovo. Scopo di questo studio è stato quello di valutare la sintesi della VTG nel plasma e nel muco di spigola (*Dicentrarchus labrax*) utilizzando sia metodi immunoenzimatici sia un biosensore ottico. Sono stati utilizzati pesci maschi adulti trattati per via i.p. con una singola dose di 0,1, 0,5, 2,5 e 5 mg/kg di 17-beta-estradiolo (E₂). Pesci trattati con il solo veicolo (olio di mais) sono stati utilizzati come controllo. Campioni di muco superficiale e sangue sono stati prelevati dopo 3, 7 e 14 giorni dal trattamento. L'induzione della sintesi di VTG è stata valutata mediante analisi Western blot ed ELISA competitivo cattura-anticorpo utilizzando anticorpi omologhi anti-VTG di spigola. L'analisi Western blot di campioni di muco e plasma di pesci trattati con E₂ ha mostrato la banda proteica relativa alla VTG di 180 kDa nel plasma e di 120 kDa nel muco. L'analisi ELISA ha mostrato che l'E₂ ha indotto in modo tempo-dipendente la sintesi di VTG sia nel plasma che nel muco, raggiungendo un massimo di induzione 14 giorni dopo il trattamento. Questi risultati indicano che anche nella spigola la VTG è un biomarker di esposizione a composti estrogenizzanti e che la valutazione di questa proteina nel muco potrebbe essere utilizzata come biomarker non invasivo. È stata inoltre valutata la possibilità di determinare i livelli di VTG mediante un biosensore ottico basato sulla risonanza plasmonica di superficie (Biacore XTM). A questo scopo sono stati studiati diversi metodi di immobilizzazione, quali il legame diretto dell'anticorpo anti-VTG sulla superficie del sensore e il metodo del *capturing antibody*. Con il biosensore allestito con questo secondo metodo è stato possibile determinare livelli di VTG nell'ordine dei ppm, indicando un utilizzo potenziale dei biosensori ottici nello screening rapido per la determinazione della VTG in campioni biologici.

P3. NEURODEGENERAZIONE DOPO IPOSSIA-ISCHEMIA DURANTE LO SVILUPPO CEREBRALE: EFFETTI NEUROPROTETTIVI DELLA SIMVASTATINA

Carloni S., Cimino M., Balduini W.

Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi di Urbino Carlo Bo, Urbino

Lo stroke perinatale rappresenta un'importante causa di deficit neurologici a lungo termine che condizionano l'intera vita dell'individuo e la sua prevenzione e trattamento rappresentano un'importante aspetto della medicina pediatrica. Studi eseguiti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che in un modello animale di ipossia-ischemia neonatale la simvastatina (Sim), un'inibitore lipofilo della 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A reduttasi, è in grado di proteggere dalla neurodegenerazione indotta da un insulto ipossico-ischemico. Il trattamento con simvastatina (20 mg/kg), riduce il danno cerebrale e migliora le alterazioni comportamentali a lungo termine ma l'effetto protettivo è osservabile solo con un trattamento profilattico². Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare: (A) i possibili meccanismi dell'attività neuroprotettiva della simvastatina; (B) l'efficacia della somministrazione di dosi più basse rispetto a quelle usate nei precedenti esperimenti o di una singola somministrazione prima dell'insulto ischemico. L'ipossia-ischemia veniva indotta al settimo giorno postnatale (PN7) mediante legatura dell'arteria carotide comune destra seguita da esposizione a ipossia per 2 ore e 30 minuti (ipossia-ischemia, HI).

(A) In questi esperimenti la Sim veniva somministrata giornalmente (s.c.) da PN1 a PN7 alla dose di 20 mg/kg e gli animali sacrificati 6 ore, 24 ore e 5 giorni dopo HI. Studi di Western blot hanno evidenziato che in seguito ad HI nella corteccia cerebrale ipsilaterale alla carotide occlusa l'espressione della procaspasi-3 e della caspasi-3 attiva aumentava 6 ore dopo HI, presentava un picco a 24 ore e ritornava ai valori di controllo dopo 5 giorni. Nel lato lesionato degli animali ischemici trattati con Sim, 24 ore dopo l'insulto l'espressione di entrambe le proteine era ridotta in modo significativo rispetto a quella degli animali ischemici trattati con il solo veicolo. L'attività della caspasi-3 seguiva lo stesso pattern dell'espressione della proteina ed era ridotta negli animali trattati con Sim confermando i risultati ottenuti negli esperimenti di Western blot. Anche la frammentazione della poli-(ADP-ribosio) polimerasi risultava significativamente ridotta negli animali ischemici trattati con Sim, mentre la scissione proteolitica di α -spectrina e della proteina chinasi C- α , utilizzati come indicatori dell'attivazione delle calpaine, risultava aumentata negli animali ischemici ma non veniva modificata dal trattamento con Sim.

(B) In questi esperimenti la Sim veniva somministrata a quattro differenti gruppi di animali: a, b) da PN1 a PN7 alla dose di 5 e 10 mg/kg, rispettivamente; c) da PN4 a PN6 alla dose di 20 mg/kg; d) come singola somministrazione 18 h prima dell'HI alla dose di 20 mg/kg. L'efficacia dei diversi schemi di trattamento è stata valutata in età adulta mediante l'uso di test comportamentali e analisi istologica finale. L'effetto neuroprotettivo della Sim era evidente sia con le dosi più basse della statina che dopo una singola somministrazione 18 h prima dell'HI.

Conclusioni. Questi risultati indicano che la simvastatina è in grado di ridurre il danno cerebrale indotto dall'ipossia-ischemia neonatale anche a dosi più basse rispetto a quelle precedentemente utilizzate^{1,2} e anche se somministrata come singola dose e che l'effetto neuroprotettivo è mediato da una riduzione dell'attivazione della caspasi-3 e della morte cellulare di tipo apoptotico.

P4. SVILUPPO DI UN APPROCCIO SPERIMENTALE PER LO STUDIO DI ASSORBIMENTO *IN VITRO* E BIODISPONIBILITÀ DEL CHLORPYRIFOS

Catone T., Tirelli V., Di Consiglio E., De Angelis I., Turco L., Testai E.
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Relativamente ai pesticidi, la via orale rappresenta la via di esposizione di maggiore interesse per la popolazione generale, che può essere esposta ai loro residui attraverso la dieta. Per valutare l'assorbimento del chlorpyrifos (CPF) nel tratto GI e i meccanismi mediante cui attraversa e/o viene modificato dalla barriera intestinale è stato utilizzato un modello *in vitro* costituito da cellule della linea cellulare Caco-2/TC7. Uno degli scopi dello studio è stato quello di caratterizzare il sistema sperimentale e ottenere una stima attendibile della reale esposizione *in vitro*, in quanto per sostanze lipofile come il CPF ($\log K_{ow}=5,4$), la concentrazione nominale di esposizione cui sono normalmente attribuiti gli effetti e i fenomeni osservati a livello cellulare, può differire notevolmente da quella reale. La determinazione del CPF e dei suoi metaboliti (CPF-oxon e 3,5,6-tricloro-2-piridinolo) è stata condotta con analisi HPLC. Sono state utilizzate concentrazioni nominali di CPF (30, 50 e 250 μ M) rappresentative di condizioni di esposizione umana. Preliminarmente sono stati quantificati l'adsorbimento del CPF ai diversi materiali utilizzati e l'interazione con i componenti del terreno. Per lo stoccaggio di soluzioni e terreni è stato scelto materiale in vetro, in quanto la plastica determina una diminuzione della concentrazione di CPF >60%. In piastra, in assenza di cellule, \approx 90% del CPF si adsorbe alla plastica. In presenza del monostrato \approx 80% delle concentrazioni nominali si recupera all'interno delle cellule; il mancato recupero nel mezzo di coltura permette di attribuire il restante 20% all'adsorbimento del CPF al polistirene e di calcolare le concentrazioni reali di esposizione in 25, 40 e 200 μ M. In queste condizioni non sono stati evidenziati segni di citotossicità dopo 8 ore di trattamento, valutata mediante saggi di vitalità cellulare (assunzione di rosso neutro e contenuto proteico totale).

Gli studi di assorbimento effettuati su supporti bidimensionali, mostrano che dopo 8 ore dall'inizio del trattamento, indipendentemente dalla concentrazione utilizzata, il CPF è presente nel comparto apicale a livelli trascurabili (\approx 3%) mentre \approx 40% rimane all'interno delle cellule e il resto passa nel comparto basolaterale, dal quale però può essere recuperato solo dopo desorbimento dal supporto in plastica. Non sono stati mai identificati i due metaboliti del CPF: il risultato è stato attribuito alle ridotte capacità metaboliche della linea cellulare, evidenziate con markers specifici (es: testosterone). Al fine di individuare possibili meccanismi di trasporto e/o estrusione (es: mediante P-gp) dei metaboliti del CPF, presumibilmente presenti in condizioni fisiologiche, sono attualmente in corso studi di induzione dell'attività metabolica delle Caco-2/TC7.

P5. EFFETTO DEL β -NAFTOFLAVONE SULL'ESPRESSIONE DI ALCUNE ISOFORME P450 E DI ENZIMI DI FASE II NEL POLMONE DI SUINO

Chirulli V.¹, Fiorio R.¹, Longo V.¹, Marvasi L.², Gervasi P.G.¹

¹*Istituto di Fisiologia Clinica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pisa;* ²*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi di Bologna*

Negli ultimi anni l'interesse per lo studio del *drug metabolism* nel suino è aumentato data l'importanza di questa specie a livello zootecnico, medico (per gli xeno-trapianti nell'uomo) e come possibile modello animale per gli studi preclinici di nuovi farmaci. Mentre nel suino le conoscenze del sistema metabolico degli xenobiotici a livello epatico sono piuttosto avanzate, scarse o nulle sono le informazioni per i tessuti extraepatici, come per il polmone. Quest'ultimo è un organo primario per l'attivazione e il metabolismo degli xenobiotici ambientali e dei farmaci disponibili per via inalatoria ed ematica. È in quest'ambito di ricerca che si inserisce il nostro studio condotto su suini di controllo e pretrattati con β -naftoflavone (40 mg/kg per 4 giorni i.p.), noto induttore, nei roditori, tramite il recettore AhR (aryl hydrocarbon receptor) dei citocromi P450 1A1, 1A2, 1B1 e di alcuni enzimi di fase II (DT-diaforasi, GST, UDP glucuronil transferasi). Dopo il trattamento con β NF, da ogni animale sono stati prelevati il fegato e il polmone da cui sono stati preparati la frazione microsomiale e citosolica ed è stato estratto l'RNA per lo studio dell'espressione genica. L'analisi di RT-PCR ha permesso di identificare nei polmoni dei suini di controllo il trascritto del CYP 1A1, 2S1 e AhR ma non quello del CYP1A2. A seguito del trattamento con β NF è stata evidenziata una forte induzione del solo CYP 1A1 e una comparsa, seppur debole, del CYP1A2. I prodotti di PCR sono stati sequenziati per calcolarne l'omologia con l'uomo e con altri animali normalmente in uso in laboratorio, riscontrando, per i suddetti geni, un'elevata omologia fra l'uomo e il suino. Questo studio ha permesso di determinare per la prima volta le sequenze porcine del CYP 1A2, 2S1 e AhR. Di rilievo è il risultato ottenuto per il CYP2S1; questa isoforma, specifica delle vie aeree, è stata individuata nell'uomo solo recentemente e non se ne conosce la funzione. L'induzione del CYP1A1 e dell'1A2 è stata confermata a livello proteico tramite delle attività marcatrici: etossiresorufina-deetilasi, metossiresorufina deetilasi, acetanilide idrossilasi e etossicumarina demetilasi. A differenza di quanto riportato per i roditori, non si è riscontrata un'induzione da parte del β NF del glutatione-S-transferasi e del DT-diaforasi, ipotizzando una regolazione specie-specifica di questi due enzimi.

P6. ORGANOCLORURATI E PCB NELLE UOVA NON SCHIUSE DI GHEPPIO

Costantini D.^{1,2}, Martínez-López E.³, Wright J.⁴, Dell’Omo G.^{5,6}, Shore R.⁴

¹*Dipartimento di Biologia Animale e dell’Uomo, Università degli Studi La Sapienza, Roma;*

²*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,*

Roma; ³*Faculty of Veterinary Science, University of Murcia;* ⁴*Centre for Ecology &*

Hydrology, Monks Wood, Huntingdon; ⁵*Anatomy Institute, University of Zurich-Irchel;*

⁶*Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Durante la stagione riproduttiva 2004 sono state raccolte 23 uova non schiuse da cassette nido di gheppio (*Falco tinnunculus*) montate sui tralicci dell’alta tensione nella provincia di Roma. Dopo le procedure di estrazione e purificazione, gli analiti sono stati determinati tramite gas-cromatografia. Le analisi hanno rilevato in 21 uova elevate concentrazioni di composti organoclorurati e di diversi congeneri dei PCB. In particolare, i congeneri 138, 153 e 180 (tre congeneri con struttura diversa da quella della diossina che sono stati già stati rilevati nei derivati del latte e nella carne bovina) hanno mostrato le concentrazioni più elevate. Inoltre, sono stati identificati una serie di congeneri più leggeri (18, 28, 31, and 52) da due uova raccolte da un nido in una zona a sud della città di Roma. Questo studio ha messo in evidenza come il gheppio possa rappresentare un buon indicatore per l’esposizione locale di organismi a contaminanti ambientali.

P7. L'INTERAZIONE TRA FATTORI GENETICI E AMBIENTALI NEL RISCHIO DI INSORGENZA DEL CANCRO GASTRICO

D'Errico M.¹, Palli D.², Calcagnile A.¹, Ottini L.³, Blasi M.¹, Giuliani A.¹, Viti V.⁴, De Rinaldis E.⁴, Palombo F.⁴, Dogliotti E.¹

¹*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ²*Unità Operativa di Epidemiologia Molecolare e Nutrizionale, CSPO, Firenze;* ³*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi La Sapienza, Roma;* ⁴*Istituto di Ricerca di Biologia Molecolare, Pomezia*

L'interazione tra esposizione a mutageni ambientali e alterazioni nei sistemi di riparazione del DNA può contribuire all'instabilità genomica, responsabile della trasformazione neoplastica. Il cancro gastrico (CG) è tra le principali cause di mortalità nel mondo. In Italia, in particolare in Toscana, sono presenti aree caratterizzate da elevati tassi di mortalità per questo tumore. L'eziopatogenesi del CG è molto complessa, coinvolgendo fattori quali lo stile di vita (in particolare le abitudini alimentari), agenti patogeni (*Helicobacter pylori*) e determinanti ambientali e genetici. Lo scopo del lavoro è valutare se la variabilità interindividuale nella capacità di riparazione del danno al DNA possa contribuire a spiegare la diversa suscettibilità al CG nella popolazione italiana. Attraverso uno studio caso controllo è stata condotta l'analisi dei polimorfismi di geni coinvolti nella riparazione del DNA, nella risposta infiammatoria, e nel metabolismo degli xenobiotici. Questo set di dati ha permesso di valutare il ruolo delle interazioni gene-gene nella suscettibilità al CG. Abbiamo inoltre analizzato il profilo di espressione genica su un sottogruppo di tumori gastrici, caratterizzati per instabilità dei microsatelliti (MSI), confrontandolo con il relativo profilo genico del tessuto non tumorale adiacente. I risultati di questo studio potranno contribuire alla comprensione delle basi molecolari dell'insorgenza del CG, ma costituiranno anche una utile risorsa per il futuro sviluppo di bersagli terapeutici e marcatori diagnostici.

P8. HL60 PROMIELOCITI UMANI COME SISTEMA MODELLO PER TUTTE LE STAGIONI

Di Carlo B., Cesetti A., Maggi A., Saporà O.

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La linea cellulare HL60 è stata isolata dal sangue di un paziente con leucemia promielocitica acuta. Presenta un numero di cromosomi variabile da 45 a 46 con anomalie che riguardano soprattutto i cromosomi 5, 8 e X. Ha la caratteristica di andare incontro, sotto opportuni stimoli chimici, a processi di differenziamento di tipo mieloide. Sostanze diverse possono indurre differenti processi: per esempio il DMSO e l'acido retinoico inducono al differenziamento granulocitico, mentre gli esteri del forbole portano alla formazione di monociti e macrofagi. In ambedue i casi le cellule perdono la loro capacità proliferativa con accumulo in fase G0 come risulta dall'analisi citofluorimetrica. Inoltre prolungati passaggi a bassa densità (oltre il 30°) inducono fenomeni di invecchiamento particolarmente evidenti sulle membrane cellulari. Questi fenomeni sono dovuti a un accumulo di colesterolo e di sfingomielina che induce una maggiore resistenza al danno ossidativo radioindotto. Negli esperimenti riportati sono considerate proliferanti (AP) cellule HL60 in fase logaritmica della curva di crescita (utilizzate entro i primi 10 passaggi), per differenziate (D) cellule HL60 indotte a monociti/macrofagi a seguito di trattamento con PMA per 72 ore e per invecchiate (O) cellule HL60 dopo il 30° passaggio. Sono stati valutati i seguenti end-points: l'ordine e la struttura delle membrane cellulari, la struttura del nucleo, il livello intracellulare di specie reattive dell'ossigeno, la concentrazione del GSH cellulare e i danni introdotti dalle radiazioni ionizzanti sul DNA cellulare (ssb e dsb rispettivamente singole e doppie rotture della catena). I metodi utilizzati sono basati sull'impiego di probes e tecniche di fluorescenza come: il Comet Assay, per il danno al DNA, la Polarizzazione Generalizzata, per le membrane, e la citofluorimetria a flusso, per la valutazione del ciclo e del livello intracellulare di ROS. Il GSH invece è stato misurato con un metodo colorimetrico. I risultati mostrano che: (i) l'ordine delle membrane cellulari in cellule sia D che O è differente da quello presente in cellule AP, risultando più rigide a causa dell'accumulo di colesterolo (O) o di un differente ordine strutturale (D); (ii) la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è più alta in cellule D che in cellule AP e O; (iii) la concentrazione di GSH intracellulare cresce secondo il seguente ordine AP<O<D; (iv) il numero di ssb prodotto per unità di dose è minore di 2,98 volte in cellule D e 1,60 volte in cellule O rispetto al numero misurato in cellule AP; (v) cellule AP e O mostrano lo stesso indice di produzione di dsb per unità di dose, mentre in cellule D l'ammontare è 3,21 volte minore. I risultati indicano che cellule indotte al differenziamento mostrano una maggiore resistenza nei confronti del danno di tipo ossidativo rispetto a cellule proliferanti sia AP che O. Inoltre cellule HL60 in seguito a processi di senescenza mostrano un comportamento differente in risposta ad agenti genotossici rispetto ad altre linee cellulari *in vitro*.

P9 ALTERAZIONE DEGLI ENZIMI DEL METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI ED EFFETTI SU PARAMETRI SESSUALI IN RATTI MASCHI ESPOSTI IN ETÀ ADOLESCENZIALE A METILFENIDATO

Di Consiglio E.¹, De Angelis G.¹, Adriani W.², Laviola G.², Traina E.³, Guarino M.³, Natoli A.³, Testai E.¹

¹Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Dipartimento Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il metilfenidato (MPH), recentemente introdotto anche in Italia, è la terapia di elezione per il trattamento di bambini e adolescenti con disturbi dell'attenzione con o senza iperattività (ADHD). Finora sono stati trascurati i possibili effetti dovuti a interazioni del MPH con altri xenobiotici (terapie multifarmaco o esposizione simultanea a contaminanti ambientali) e/o con sostanze endogene (ormoni steroidei). In questo ambito un ruolo chiave riveste l'identificazione di possibili interazioni tossicocinetiche, principalmente a livello degli enzimi del metabolismo. Tali enzimi per le loro caratteristiche mostrano un ampio spettro di azione con sovrapposizione di substrati, che possono competere tra loro (inibizioni), sono inducibili e nei bambini (popolazione target della terapia) rappresentano uno dei sistemi in continuo sviluppo. Obiettivo del lavoro è stato l'identificazione di possibili effetti sui CYPs dovuti all'esposizione a basse dosi di MPH in ratti adolescenti, corrispondenti alla dose di trattamento consigliata per l'azione farmacologica (1-3 mg/kg/d). A tale scopo alcune attività marker di singoli CYP sono state determinate in preparazioni microsomiali epatiche di ratti (30-44gg) di controllo (salina) e trattati con 2 mg/kg i.p di MPH sia in dose singola che ripetuta (15gg). Il contenuto totale di P450 epatico, mostra un leggero incremento, in assenza di una significativa alterazione nel contenuto proteico totale. Tra le attività marker particolare attenzione è stata data al metabolismo del testosterone (TST) a opera di specifici CYPs. L'analisi dei livelli di androstenedione e dei metaboliti idrossilati del TST ha mostrato che il trattamento acuto e subacuto con MPH produce un incremento statisticamente significativo nella formazione di tutti i metaboliti (escluso l'androstenedione). Tra le possibili conseguenze di una aumentata capacità catabolica del TST sono stati valutati gli effetti su parametri riproduttivi maschili, dovuti a una alterazione nell'omeostasi degli ormoni steroidei. La valutazione di parametri sessuali nei ratti ha mostrato che l'esposizione acuta e subacuta al farmaco produce un leggero incremento sia nella conta spermatica che nel peso del testicolo, mentre la concentrazione del TST testicolare subisce una diminuzione del 40%. Ipotizzando un possibile meccanismo di compensazione ormonale a opera dell'aromatasi, enzima che converte il TST in estrogeni, la sua attività è stata determinata in incubazioni di microsomi epatici degli stessi animali. Nessuna differenza significativa è stata evidenziata nei livelli di aromatasi misurati. Questi risultati suggeriscono come l'induzione dei CYPs epatici da parte del MPH, non solo deve essere considerata per un eventuale attività di interferenza

endocrina, ma risulti un elemento critico nella valutazione di possibili interazioni dovute a esposizioni contemporanee a diversi xenobiotici nei bambini.

Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con “NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC)”

P10. TOSSINE BATTERICHE E CICLO CELLULARE: RUOLO DEL FATTORE CITOTOSSICO NECROTIZZANTE 1 DI *ESCHERICHIA COLI*

Falzano L.¹, Filippini P.², Travaglione S.¹, Giamboi Miraglia A.¹, Fabbri A.¹, Fiorentini C.¹
¹*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ²*Dipartimento di
Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Numerose strategie vengono utilizzate dai batteri patogeni per manipolare le funzioni cellulari dell'ospite. Negli ultimi anni, a esempio, sono state identificate numerose tossine proteiche prodotte da diverse specie batteriche capaci di modulare il ciclo cellulare dell'ospite. In questo contesto, gli studi da noi condotti suggeriscono che una tossina proteica, chiamata fattore citotossico necrotizzante 1 (CNF1) isolata da ceppi uropatogeni di *Escherichia coli*, è capace di controllare la progressione del ciclo cellulare nella linea uroepiteliale T24. Come è noto, questa tossina attiva permanentemente le GTPasi monomeriche della famiglia Rho, proteine coinvolte sia nella organizzazione dell'actina citoscheletrica che nella regolazione di numerose funzioni cellulari, tra cui la proliferazione e il controllo del ciclo cellulare. Gli studi da noi condotti hanno evidenziato che l'esposizione al CNF1 induce nelle T24 un accumulo delle cellule nella fase G₂/M del ciclo cellulare. Questa attività anti-proliferativa della tossina è associata al sequestro nel citoplasma della ciclina B1 e a una marcata riduzione dell'espressione di questa proteina. Va sottolineato, inoltre, che il CNF1, pur bloccando le T24 in fase G₂/M, non induce morte cellulare per apoptosi nelle cellule trattate. In conclusione, i risultati da noi ottenuti ci permettono di includere il CNF1 nella lista delle cosiddette "ciclomoduline", ossia di quelle tossine capaci di modulare il ciclo cellulare. In questo scenario, è possibile ipotizzare che il CNF1, bloccando il ciclo cellulare senza "condannare" a morte le cellule, possa rappresentare un rischio per la trasformazione neoplastica nei tessuti uroepiteliali infettati da *E. coli*. Questa ipotesi è in accordo con diversi studi condotti su modelli sperimentali *in vivo* che indicano come i ceppi di *E. coli* uropatogeni rappresentino un fattore di rischio nello sviluppo del cancro nella vescica.

P11. VALUTAZIONE DI DANNI AL DNA LINFOCITARIO E PROCESSI RIPARATIVI, MEDIANTE COMET ASSAY, IN SOGGETTI EX-ESPOSTI AD AMIANTO E IN PAZIENTI CON MESOTELIOMA PLEURICO

Franceschetti P.¹, Doria D.¹, Romeo L.², Foti T.², Perbellini L.², Fracasso M.E.¹

¹Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Verona; ²Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina del Lavoro, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Verona

L'amianto è stato ampiamente utilizzato in passato soprattutto per le sue particolari caratteristiche chimico-fisiche di resistenza al calore e al fuoco. Recenti studi sulle proiezioni della mortalità per mesotelioma maligno da amianto hanno stimato che il numero dei soggetti che moriranno a causa di questo tipo di cancro passeranno dai 5.000 decessi del 1998 a circa 9.000 nel 2018. Da qui nasce l'esigenza di dover trovare dei biomarcatori precoci legati alla prima fase della cancerogenesi. Diversi autori hanno riportato che le fibre di amianto *in vitro* sono citotossiche e sono in grado di provocare danni genetici. Gli effetti genotossici dell'amianto possono essere riconducibili a un insulto fisico diretto o attraverso formazione di specie reattive dell'ossigeno. Alcuni autori hanno riscontrato che cellule mesoteliali umane esposte *in vitro* a fibre di asbesto presentavano maggiori e persistenti danni al DNA valutati mediante comet assay. Lo scopo di questa ricerca è quello di valutare i danni al DNA indotti dall'esposizione e la capacità riparativa individuale in linfociti di soggetti ex esposti ad amianto e in pazienti con mesotelioma pleurico, utilizzando il comet assay. La capacità riparativa viene valutata mediante comet assay trattando i linfociti con 100 µM di H₂O₂ per 5 min, quindi le cellule vengono mantenute a 37°C per 20-60 min per favorire la riparazione. Dati preliminari indicano che i valori di danno basale al DNA in soggetti ex-esposti e in pazienti con mesotelioma non si discostano dai valori di controllo. Il danno indotto dall'H₂O₂ porta a un significativo aumento di tutti i parametri di danno negli ex-esposti rispetto ai controlli, mentre i soggetti con mesotelioma non mostrano differenze significative rispetto ai controlli tranne che per la lunghezza della coda (38,13±12,05 vs controllo 26,27±9,96; p<0,05). I dati relativi all'efficienza riparativa nei diversi gruppi indicano che il controllo ripara completamente i danni dopo 20 min con un t_{1/2} di 7,7 min, mentre negli ex-esposti e nei pazienti con mesotelioma il danno cellulare non viene riparato dopo 60 min, con un t_{1/2} calcolato di 21,27 min e di 41,44 minuti, rispettivamente. Questi risultati, indicano che l'esposizione ad amianto non induce danni basali al DNA, ma che l'insulto si rende più evidente nei processi di danno e riparazione cellulare. In particolare i linfociti dei soggetti ex-esposti presentano un significativo aumento nel danno indotto dall'H₂O₂, mentre nei soggetti ex-esposti con mesotelioma il dato più significativo risulta essere la marcata inefficienza nei processi riparativi cellulari.

P12. OCRATOSSINA A NELLA FILIERA VITIVINICOLA: VALUTAZIONE E GESTIONE DEL RISCHIO

Grippi F.¹, Crosta L.¹, Aiello G.¹, Curione A.¹, D'Amico R.¹, Oliveri F.¹, Schiavo M.R.³, Tolomeo M.², Gebbia N.¹

¹*Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura, Palermo;* ²*Divisione di Ematologia, Policlinico, Università degli Studi di Palermo;* ³*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo*

Le micotossine sono prodotti del metabolismo secondario di funghi o muffe. La contaminazione da micotossine è influenzata non solo dalle condizioni climatiche e geografiche, ma anche e principalmente dalle modalità di coltivazione e di conservazione delle derrate, tenendo anche in considerazione che alcuni alimenti sono più suscettibili di altri alla crescita fungina. Sono sostanze tossiche per la salute umana che possono agire a livello dei vari sistemi e apparati (epatico, renale, neurologico, gastrointestinale, ematopoietico, riproduttivo, immunologico) e possono avere azioni genotossiche, cancerogene e teratogene. Tra le micotossine riveste una fondamentale importanza per la sua elevata diffusione e rilevanza tossicologica l'Ocratossina A (OTA), prodotta da funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium*, in particolare *A. ochraceus* e *P. verrucosum*. L'OTA ha azione nefrotossica, teratogena, immunosoppressiva e cancerogena. L'OTA è largamente diffusa in un gran numero di matrici alimentari (cereali, legumi, semi di cacao e di caffè, birra). Anche le uve e i suoi derivati sono considerati prodotti a rischio di contaminazione in quanto i miceti presenti nel terreno, possono trovarsi sui grappoli già nella fase fenologica dell'allegagione. Le condizioni ambientali, umidità e alte temperature, giocano un ruolo di primaria importanza nel determinarne la presenza. Con un nuovo Regolamento (123/2005 del 26 gennaio scorso) la Commissione Europea ha fissato la concentrazione massima ammissibile di ocratossina A nel vino, nel mosto e nel succo d'uva in 2 microgrammi/Kg. Superato tale limite, dall'aprile del 2006, questi prodotti non potranno essere commercializzati. Scopo del presente studio è stato il monitoraggio del rischio da OTA nella Regione Siciliana che, per le sue condizioni pedo-climatiche viene considerata una regione a rischio. In una prima fase è stata effettuata la valutazione dell'eventuale presenza di OTA nei vini siciliani, liquorosi (moscato, passito, malvasia etc) e non (Nero d'Avola, Merlot, Nerello Mascalese, Perricone, Cabernet Sauvignon, Syrah, Chardonnay, Inzolia, Grillo, Grecanico, etc). Sono stati analizzati circa 350 campioni provenienti da diverse annate di produzione (2002, 2003, 2004). Il dosaggio è stato effettuato tramite HPLC con rivelazione fluorimetrica secondo la tecnica di Brera et al. Poiché anche minime quantità possono derivare da una contaminazione dell'uva stessa, la seconda fase del nostro studio ha previsto una valutazione delle concentrazioni di OTA lungo la filiera vitivinicola uva – vino, al fine di identificare le tecniche e le misure agronomiche ed enologiche, che possano influenzarne il contenuto.

La ricerca è stata finanziata dall'Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana

P13. EFFETTI DI BASSE DOSI DI PIOMBO NELLA DIETA SUI LIVELLI DI CITOCHINE IN TOPI SWISS

Iavicoli I., Carelli G.

Istituto di Medicina del Lavoro, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Numerosi studi in letteratura hanno evidenziato gli effetti immunotossici indotti dal piombo, in particolare sui linfociti T. Scopo di questo studio è stato di verificare questa risposta per un ampio intervallo di dosi. A femmine di topo Swiss, un giorno dopo l'accoppiamento, sono state somministrate sei diete contenenti differenti livelli di piombo acetato che andavano da 0,02 a 400 ppm. Durante l'allattamento le madri hanno ricevuto la stessa dieta somministrata loro durante la gravidanza. Le medesime diete sono state inoltre somministrate ai figli per nove mesi dopo lo svezzamento. Al termine dell'esposizione, nei figli sono stati determinati i livelli ematici di piombo e valutati nel siero le eventuali modificazioni nei livelli di due citochine di tipo 1 (IL-2, INF- γ) e di una di tipo 2 (IL-4). Alle concentrazioni più elevate di Pb nella dieta (40 e 400 ppm) vi è stato un significativo aumento nella produzione dell'IL-4 associata a una forte diminuzione nella produzione di INF- γ e IL-2. Al più basso livello (0,02 ppm) che ha determinato una piombemia pari a 0,8 $\mu\text{g/dL}$, ben al di sotto dei normali livelli che ritroviamo nella popolazione generale (2 – 3 $\mu\text{g/dL}$), si è osservato un aumento nella produzione di INF- γ e IL-2 con una significativa diminuzione della produzione di IL-4. I dati sono di notevole interesse poiché indicano che il piombo acetato somministrato per via orale nel modello animale in studio determina significativi effetti biologici al di sotto delle concentrazioni ritenute normali.

P14. BIOINDICATORI DI ESPOSIZIONE: LIVELLI DI PCB E PCDD/F NELLA POPOLAZIONE ITALIANA

La Rocca C., Abate V., Alivernini S., Battistelli C.L., Casella M., Turrio Baldassarri L.
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

PCDD/PCDF e PCB sono contaminanti ambientali ubiquitari, a elevata persistenza ambientale e soggetti a processi di bioaccumulo negli organismi esposti. Diretta conseguenza del bioaccumulo è il processo di biomagnificazione lungo la catena trofica, per cui un organismo che occupa posizioni più elevate nella piramide alimentare si trova esposto non solo alla concentrazione presente nell'ambiente ma anche a quella presente negli alimenti che ingerisce. Infatti proprio gli alimenti costituiscono la maggiore via di esposizione umana. Nell'organismo umano, i contaminanti organoclorurati possono essere escreti come tali o trasportati dal sangue nel fegato, sede di processi metabolici possibili per alcuni congeneri, e nei tessuti adiposi, sede di accumulo. L'interesse verso questi composti è determinato dagli effetti tossici che provocano, quali dermatossicità, immunotossicità, disturbi della funzionalità riproduttiva, teratogenicità, alterazioni del sistema endocrino ed effetti cancerogeni. La misura di questi contaminanti nella componente lipidica dei tessuti e dei fluidi biologici umani costituisce un diretto indicatore di esposizione della popolazione, poiché in tal modo si può determinare il carico corporeo (body burden), ritenuto dall'EPA uno degli strumenti principali per una corretta valutazione del rischio, insieme alla determinazione della tossicità equivalente (TEQ). In questo studio vengono riportate le concentrazioni di PCB, PCB diossina-simili, PCDD/F in tessuti adiposi ed ematici misurate in differenti gruppi di popolazione italiana generale, che pertanto forniscono un'informazione sui livelli di fondo (background) presenti. In contrapposizione, sono riportati i valori relativi agli stessi contaminanti riscontrati nel tessuto ematico di un gruppo di persone esposto in maniera continuativa ad alimenti prodotti in una zona interessata da una contaminazione industriale; in questo caso il contributo tossicologico totale risulta essere superiore anche più di un ordine di grandezza rispetto ai non esposti. I livelli di tali contaminanti sono confrontati con alcuni dati di letteratura, in particolare con quelli relativi alla popolazione italiana: in questo caso, appare evidente che il ristretto numero di dati disponibili rende auspicabile ulteriori studi di monitoraggio per la valutazione dell'esposizione e del rischio associato.

P15. NEI LINFOCITI UMANI GLI EFFETTI DELLA CARENZA DI ACIDO FOLICO IN COLTURA SONO MODULATI DAL GENOTIPO PER LA MTHFR

Leopardi P., Marcon F., Caiola S., Zijno A., Crebelli R.

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'acido folico ha un ruolo decisivo nel mantenimento dell'integrità genomica, regolando alcuni processi-chiave del metabolismo del DNA con la funzione di donatore di gruppi metilici, sia per la sintesi dei precursori del DNA (sintesi della timina a partire dall'uracile), sia per la metilazione del DNA. Studi epidemiologici hanno messo in luce che l'alterazione nel metabolismo dei folati e/o la carenza di folati nella dieta rappresentano fattori di rischio per l'insorgenza di malattie dell'apparato cardiovascolare, di malformazioni congenite (difetti del tubo neurale, spina bifida), per la sindrome di Down e per l'insorgenza di tumori (colon-retto, seno, prostata, stomaco). Basse concentrazioni di acido folico nel sangue determinano infatti una aumentata incidenza di danno al DNA cellulare, che può avere un ruolo nell'insorgenza di patologie tumorali. In carenza di acido folico la mancata disponibilità di gruppi metilici è causa sia di misincorporazione di uracile nel DNA, con formazione di rotture a singolo e doppio filamento, sia di diminuzione del livello di metilazione del DNA con ripercussioni sull'espressione genica. Studi recenti indicano che gli effetti della carenza di folati sono modulati da fattori ambientali, legati allo stile di vita, e da fattori genetici. La maggior parte dei geni coinvolti nel metabolismo dell'acido folico sono infatti polimorfici, con alcune forme varianti associate a ridotta attività enzimatica. Di particolare interesse è il polimorfismo del gene della metilene-tetraidrofolato-reduttasi (MTHFR), che controlla una reazione chiave nel metabolismo dei folati, la conversione del 5,10-metilentetraidrofolato in 5-metil-THF, e che alcuni studi epidemiologici associano a un aumentato rischio di tumore. In questo studio è stato analizzato l'effetto genetico della carenza di acido folico indotta *in vitro* in colture di linfociti di individui con genotipo MTHFR wild type, omozigote variante o eterozigote. Sono stati analizzati diversi marcatori di danno al DNA: Micronuclei, indicatori di rotture e perdite cromosomiche, Nucleoplasmic Bridges, possibili indicatori di aberrazioni complesse, e Buds, ritenuti indicatori di amplificazione genica. Il contenuto dei micronuclei indotti dalla carenza di acido folico è stato caratterizzato attraverso anticorpi anti-cinetocore. Lo studio ha messo in evidenza una aumentata instabilità genomica in carenza di folati in individui MTHFR varianti, probabilmente associata a una ridotta capacità di riparazione, misurata attraverso un saggio di sensibilità ai raggi gamma. È in corso la determinazione del livello di metilazione del DNA negli stessi donatori, per verificare il possibile coinvolgimento, negli effetti osservati, di alterazioni epigenetiche, dovute all'alterazione del processo di metilazione.

P16. STUDIO DELLA HEAT SHOCK PROTEIN 70 NELLA PATOGENESI DELLE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI

Lu M., Sbriccoli M., Poleggi A., Cardone F., Pocchiari M.

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) sono un gruppo di malattie neurodegenerative causate da un agente trasmissibile non ancora chiaramente identificato. Le TSE sono caratterizzate da una degenerazione spongiforme del tessuto nervoso accompagnata da una attivazione gliale (astro-e microglia) e da morte neuronale diffusa. L'evento patogenetico centrale è rappresentato dall'accumulo nel sistema nervoso centrale, e in misura minore in altri organi, della proteina amiloidea patologica (PrP^{TSE}) prodotta in seguito a un riarrangiamento conformazionale da un precursore fisiologico (PrP^c). Il tessuto colpito non riesce a degradare la PrP^{TSE} prodotta dalle cellule infettate che forma quindi degli aggregati insolubili che si associano alla neurodegenerazione. La rimozione della proteina amiloidea potrebbe dunque permettere di arrestare il processo degenerativo ed eventualmente bloccare la progressione della malattia. Uno dei meccanismi a disposizione delle cellule per eliminare aggregati proteici patologici consiste nella attivazione del complesso delle chaperonine o proteine da shock termico (Heat shock proteins, HSP) che riescono a solubilizzare gli aggregati proteici permettendone o il folding fisiologico oppure la degradazione proteolitica. Lo scopo del nostro studio è quello di analizzare se la sovraespressione del gene HSP70 è in grado di rallentare la progressione della malattia utilizzando un modello sperimentale rappresentato da topi transgenici che sovraesprimono la HSP70 infettati per via intracerebrale con il ceppo di scrapie 139A. L'analisi dei tempi di incubazione e delle caratteristiche neuropatologiche (profilo delle lesioni e analisi immunoistochimica per la PrP^{TSE}) dimostrano che non risulta esserci un rallentamento della progressione della malattia nei topi transgenici omozigoti ed eterozigoti rispetto a quelli senza transgene, né risultano esserci sostanziali differenze nella tipologia e nella distribuzione delle lesioni neuropatologiche e nella localizzazione degli accumuli di PrP^{TSE}. Quindi, almeno nel nostro modello, la sovraespressione del gene HSP70 sembra inefficace nel prevenire la progressione della malattia sia a livello clinico che neuropatologico. Ulteriori studi, utilizzando altri ceppi di scrapie e altre vie di infezione (i.e. intraperitoneale), potrebbero permettere una comprensione più approfondita del ruolo del gene HSP70 nella patogenesi delle TSE.

P17. TRASPORTO VELOCE RETROGRADO DELLO SCRAPIE NEL NERVO SCIATICO

Lu M., Valanzano A., Liu Q., Di Giamberardino L., Cardone F., Pocchiari M.
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) colpiscono l'uomo e altri animali e sono causate da agenti trasmissibili che determinano una patologia neurologica progressiva e rapidamente fatale preceduta da un periodo di incubazione che può durare da alcuni mesi a diversi anni. Questi agenti infettivi, conosciuti come prioni o virus lenti non convenzionali, si replicano in elevate quantità soprattutto a livello del SNC dove avviene la produzione di lesioni caratteristiche. Da studi precedenti si evince che quando l'infezione avviene per via periferica, gli agenti delle TSE possono raggiungere il SNC attraverso i nervi periferici per via retrograda a una velocità stimata di circa 1-3 mm al giorno. Questa velocità è stata determinata misurando il tempo necessario per rilevare l'infettività o la proteina prionica patologica (PrP^{TSE}) nel distretto del SNC (gangli, midollo spinale o aree del cervello) che innervano il distretto corporeo nel quale è avvenuta l'inoculazione, o misurando la differenza fra i periodi di incubazione di animali infettati direttamente nel nervo sciatico o nel cuscinetto plantare.

Nel nostro studio, usando un approccio diverso, basato sulla resezione del nervo sciatico a tempi diversi dall'infezione e sulla determinazione dell'efficienza di infezione nei diversi gruppi abbiamo osservato che il transito retrogrado intranervale del ceppo di scrapie 263K adattato ai criceti è 25-50 volte più veloce di quanto riportato in precedenza, perciò simile a quello dei virus convenzionali. Ciò può avere una conseguenza importante per i futuri trattamenti preventivi, che hanno maggiore efficacia se somministrati prima che gli agenti delle TSE entrino nel SNC.

P18. FRAMMENTAZIONE E SINTESI RIPARATIVA DEL DNA IN COLTURE PRIMARIE DI TIROCITI UMANI ESPOSTI A CINQUE COMPOSTI CANCEROGENI PER LA TIROIDE NEL RATTO

Manfredi V., Gosmar M., Garbero C., Mattioli F.

Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Clinica, Università degli Studi di Genova

Un problema da risolvere per la valutazione del rischio genotossico/cancerogeno riguarda l'estrapolazione all'uomo dei risultati ottenuti nei roditori. Per contribuire alla soluzione di questo problema, cinque composti che inducono nel ratto lo sviluppo di adenomi e/o carcinomi delle cellule follicolari della tiroide sono stati esaminati per le capacità di indurre frammentazione e sintesi riparativa del DNA in colture primarie di cellule di tiroide umana. Ogni composto è stato esaminato su cellule di almeno tre donatori. Il "Comet assay" ha rivelato un aumento dose-dipendente e statisticamente significativo della lunghezza della coda, ossia della frequenza di rottura della singola elica del DNA e di siti alcali-labili, dopo 20 ore di esposizione alle seguenti concentrazioni sub-tossiche dei 5 composti in esame: potassio bromato (PB), nitrobenzene (NB), etilentiourea (ET) e dietiltiourea (DET), da 1,25 a 5,0 mM; metilimazolo (MZ) da 2,5 a 10 mM. Alla concentrazione più elevata l'aumento medio rispetto ai controlli della frequenza di lesioni del DNA è stato del 396% per PB, del 115% per NB, del 90% per ET, del 72% per DET e dell'88% per MZ. Nelle stesse condizioni sperimentali è stato riscontrato un aumento significativo e dose-dipendente della sintesi riparativa del DNA, valutata con metodo autoradiografico, che alla concentrazione più elevata è risultato essere, rispetto ai controlli, del 640% per PB, del 981% per NB, del 959% per ET, del 939% per DET e del 732% per MZ. Questi risultati suggeriscono che i 5 composti esaminati, dei quali l'International Agency for Research on Cancer giudica come possibili cancerogeni per l'uomo (gruppo 2B) PB e NB e come non classificabili per carenza di dati (gruppo 3) ET, DET e MZ, potrebbero causare tumori alla tiroide non solo nei ratti ma anche nella nostra specie.

P19. VARIAZIONI INDOTTE DA TOSSINE ALGALI SULLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE DI CALCIO E SULLA SOPRAVVIVENZA CELLULARE IN NEURONI PRIMARI DI CORTECCIA CEREBRALE DI RATTI

Marani L.¹, Ceredi A.³, Guerrini F.², Milandri A.³, Pistocchi R.², Boni L.², Siniscalchi A.¹

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Ferrara; ²Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna, Sede di Ravenna; ³Centro Ricerche Marine, Cesenatico, Forlì-Cesena

Alcune specie microalgali, soprattutto Dinophyceae (dinoflagellate), producono tossine che, accumulate da animali marini, possono causare nell'uomo biointossicazioni identificate con sigle indicanti sia l'organismo vettore che gli effetti principali: ASP (amnesic shellfish poisoning), DSP (diarrhetic), NSP (neurotoxic), PSP (paralytic). Diverse specie presenti in Adriatico: *Dinophysis* spp., *Gonyaulax grindleyi* (*Protoceratium reticulatum*), *Alexandrium lusitanicum* hanno causato gravi problemi sanitari ed economici.

Culture primarie di neuroni corticali di ratto (8-10 DIV) sono state utilizzate per testare alcune tossine responsabili delle intossicazioni e gli estratti algali che le contengono, valutando le variazioni indotte sulla concentrazione intracellulare di calcio ($[Ca^{2+}]_i$), misurata con FURA2, e sulla sopravvivenza cellulare, determinata con il colorante vitale MTT. La $[Ca^{2+}]_i$ basale (b) nei campioni di controllo è $70,1 \pm 4$ nM. La stimolazione elettrica a 10 Hz per 10 sec induce un aumento transitorio netto (St-b) di 69 ± 7 nM. L'acido domoico, responsabile della sindrome ASP e prodotto da *Pseudonitzschia* spp., aumenta la $[Ca^{2+}]_b$ (Emax $+143 \pm 20\%$ a $30 \mu\text{M}$) e conseguentemente riduce St-b (Emax $-62 \pm 14\%$ a $30 \mu\text{M}$). Il suo meccanismo d'azione consiste nell'attivazione dei recettori per il glutammato di tipo AMPA/Kainato, e gli effetti sono condivisi dall'acido kainico. Quest'ultimo, applicato alle colture neuronali, riduce la sopravvivenza cellulare a 24 ore in modo concentrazione-dipendente (Emax $-90 \pm 1\%$ a $100 \mu\text{M}$). La yessotossina (YTX) è una delle tossine contenute nelle alghe responsabili della sindrome DSP, ma non provoca effetti diarroici, bensì cardiotoxici e neurotossici. Il suo meccanismo d'azione non è del tutto chiarito. La YTX non modifica la $[Ca^{2+}]_b$ ma riduce il picco da stimolazione elettrica. L'effetto è concentrazione-dipendente e diventa più evidente se si prolunga il tempo di contatto con la preparazione cellulare ($-72 \pm 5\%$ a 30 min, alla concentrazione $1,5 \mu\text{M}$). L'estratto di *Protoceratium reticulatum* induce il medesimo effetto. La YTX, mantenuta a contatto con le colture neuronali per 24 ore, riduce la vitalità cellulare in modo concentrazione-dipendente (Emax $-40 \pm 4\%$ a $1 \mu\text{M}$). La tossina PSP saxitossina (STX) non modifica la $[Ca^{2+}]_b$, ma riduce in modo concentrazione-dipendente il picco da stimolazione elettrica, azzerandolo alla concentrazione $0,03 \mu\text{M}$. L'estratto di *A. lusitanicum* induce il medesimo effetto, che è da ricondurre al blocco dei canali del Na^+ , essendo condiviso dalla tetrodotossina (TTX). Quest'ultima riduce in modo concentrazione-dipendente la morte cellulare indotta da veratridina $10 \mu\text{M}$.

Questi risultati indicano che la determinazione della $[Ca^{2+}]_i$ e della sopravvivenza cellulare in neuroni corticali costituiscono un metodo sensibile per la rilevazione della presenza di tossine algali negli estratti.

P20. VARIAZIONI INDIVIDUALI DELL'ESPRESSIONE GENICA E DELLE CAPACITÀ DI RIPARO DEL DNA VALUTATE DOPO TRATTAMENTO CON LE RADIAZIONI IONIZZANTI

Marcon F.¹, Siniscalchi E.¹, Silvestrini F.¹, Giuliani A.¹, Palli D.², Crebelli R.¹

¹Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Centro per lo Studio e la Prevenzione Oncologica, Firenze

È ormai ben noto che individui diversi possono rispondere in modo differente agli agenti cancerogeni. Un obiettivo interessante della tossicologia è quello di identificare i sottogruppi della popolazione che hanno una risposta “anormale” agli agenti tossici per valutare lo specifico livello di rischio associato all’esposizione. A questo proposito, la tossicogenomica, mediante l’analisi del profilo di espressione di migliaia di geni, può rappresentare un approccio utile per chiarire la natura di tale suscettibilità individuale. In questo studio il livello di espressione di circa 1800 geni associati alla cancerogenesi è stato valutato dopo esposizione *in vitro* di linfociti umani (82 soggetti appaiati per familiarità al cancro gastrico) a raggi-gamma, con lo scopo di raccogliere dati sui processi biologici alla base della sensibilità alle radiazioni. In parallelo sono state ottenute indicazioni sulla capacità individuale di riparare il danno sul DNA mediante l’analisi dell’instabilità cromosomica indotta dalle radiazioni. Successivamente, i dati sull’espressione genica e sul danno al DNA sono stati messi in relazione alle informazioni sui fattori biologici (età, sesso, familiarità al cancro gastrico) e ambientali (abitudini al fumo) che insieme ai fattori genetici potevano modulare la suscettibilità individuale ai cancerogeni, al fine di chiarire il ruolo relativo della componente genetica e di quella ambientale nella risposta individuale a un agente genotossico. I risultati sui livelli di danno cromosomico indotto dal trattamento indicano una frequenza di micronuclei maggiore nelle donne rispetto agli uomini e nelle persone anziane rispetto a quelle giovani, suggerendo che la sensibilità alle radiazioni può essere modulata da caratteristiche individuali come il sesso e l’età e che la capacità di riparazione del danno sul DNA si riduce con l’età. Per quanto riguarda l’analisi dell’espressione genica, il confronto fra classi ha identificato una decina di geni espressi in modo significativamente diverso tra i soggetti con familiarità al cancro gastrico e i controlli, alcuni dei quali sono plausibilmente coinvolti nel tumore dello stomaco o nel processo di cancerogenesi. L’analisi delle componenti principali ha, invece, identificato nove componenti principali in grado di spiegare circa il 70% della varianza osservata. Inoltre, l’analisi di correlazione ha evidenziato un gruppo di 29 geni che mostra una correlazione positiva con l’età e negativa con un indice di proliferazione cellulare. È interessante notare che molti dei geni con i livelli di espressione minore negli anziani risultano coinvolti nei processi di proliferazione cellulare, regolazione del ciclo cellulare e apoptosi, in accordo con la diminuita proliferazione cellulare attesa con l’invecchiamento.

P21. PRESENZA DI ZEARALENONE E DEL SUO PRINCIPALE METABOLITA α -ZEARALENOLO IN CAMPIONI DI SUINI ITALIANI

Meucci V., Razzuoli E., Costa E., Mengozzi G., Soldani G.
Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Pisa

Lo zearalenone (ZEA) è una micotossina prodotta da funghi del genere *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. equiseti*). Lo ZEA è presente soprattutto nel mais ma può riscontrarsi anche in cereali quali orzo, grano, sorgo, miglio e riso. Chimicamente lo ZEA è il lattone dell'acido resorciclico e i suoi principali metaboliti sono l'alfa e il beta zearalenolo (α ZEA e β ZEA). Questa tossina possiede spiccati effetti estrogenici e diversi studi hanno ipotizzato la sua azione tossica nello sviluppo di patologie quali il telarca. Il Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ha stabilito un livello massimo tollerabile provvisorio di assunzione giornaliera per lo ZEA e i suoi metaboliti (incluso l' α ZEA) di 0,2 μ g/kg per peso corporeo. Scopo del presente studio è stato di sviluppare un nuovo metodo HPLC per la determinazione dello ZEA e del suo metabolita α ZEA nel plasma e nelle salsicce di suini. Sono stati analizzati 112 campioni di plasma suino, provenienti da diversi allevamenti distribuiti tra Toscana ed Emilia-Romagna, per un totale di 26 lotti ognuno dei quali proveniente da un diverso allevamento. Di 8 lotti sono state preparate e analizzate salsicce fresche. Il sistema HPLC era costituito da una pompa JASCO 880 PU (JASCO, Tokio, Japan) a flusso variabile e da un rivelatore fluorimetrico JASCO 821-FP settato a una lunghezza d'onda di eccitazione di 274 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 440 nm. Sono state impiegate una colonna cromatografica Spherisorb Waters (150x4,60 mm) con granulometria delle particelle di 3 μ m, una precolonna Waters Guard-PakTM (Waters, Milford, MA, USA), entrambe impaccate con gel di silice derivatizzato con gruppi alchilici C18, e un integratore Spectra-Physics 4270 (Spectra Physics, Milano, Italia). Il metodo impiegato è risultato lineare per concentrazioni di ZEA e α ZEA comprese tra 25 e 400 ng/ml con un limite di quantificazione di 0,05 ng/ml e un limite di determinazione di 0,01 ng/ml. Il recupero delle estrazioni dal plasma è stato di $97 \pm 15\%$ e $111 \pm 10\%$ per lo ZEA e l' α ZEA, rispettivamente. Il recupero delle estrazioni dalle salsicce è stato di $67 \pm 15\%$ e $65 \pm 10\%$ per lo ZEA e l' α ZEA, rispettivamente. 16 campioni di plasma sono risultati contaminati da α ZEA (14,3%) nel range di 0,10-7,85 ng/ml. Di questi campioni 2 sono risultati contaminati anche da ZEA (2,08-5,04 ng/ml). 2 salsicce degli 8 lotti esaminati hanno mostrato la presenza dell' α ZEA con una quantità pari a 0,8 e 0,5 ng/g di tessuto omogenato. Nei campioni di plasma e di salsiccia è stato ritrovato con maggiore frequenza l' α ZEA rispetto allo ZEA, essendo esso il principale metabolita di questa micotossina. Questi risultati indicano che la contaminazione da α ZEA non è uniforme tra i soggetti appartenenti a un unico lotto e rientra nel range riportato in letteratura per altri stati europei.

P22. PRESENZA DI OCRATOSSINA A IN PRODOTTI DEL COMMERCIO CONTENENTI CEREALI DA AGRICOLTURA CONVENZIONALE E BIOLOGICA

Molfino S., Fuggetta D., Ballabio C., Galli C.L., Restani P.
Laboratorio di Tossicologia, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

L'ocratossina A è una micotossina prodotta principalmente dalle specie fungine *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus ochraceus*. Sebbene considerata un tipico contaminante dei cereali, la sua presenza è stata rilevata anche in altri prodotti come frutta essiccata, noci, carne e loro derivati. Per determinare la quantità di ocratossina A che potrebbe essere ingerita mediante l'assunzione di una dieta media italiana, presso il nostro laboratorio sono stati analizzati 211 prodotti del commercio a base di cereali (farine e prodotti da forno). I prodotti analizzati provenivano da 3 diverse tipologie agricole: coltura tradizionale, biologica e lotta integrata. L'analisi è stata effettuata mediante tecnica HPLC dopo purificazione del campione per cromatografia di affinità. Tutte le farine e i prodotti contenenti cereali esaminati contenevano concentrazioni di ocratossina A inferiori al limite di legge (3 µg/kg): il valore più elevato, 0,816 µg/kg, è stato ritrovato in un campione di farina integrale di farro proveniente da agricoltura biologica. Di tutti i prodotti per lo svezzamento a base di cereali da noi analizzati, solo quattro campioni sono risultati superiori al limite legale particolarmente restrittivo stabilito dall'Unione Europea di 0,5 µg/kg. Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra prodotti da agricoltura tradizionale e biologica, quando vengono considerati i prodotti nella loro globalità. Viceversa differenze significative sono state riscontrate durante l'analisi di alcune categorie di prodotti (vale a dire prodotti per l'infanzia come semolino e creme di riso) con casi di maggior contaminazione nei prodotti tradizionali e casi di maggior contenuto di Ocratossina A nella versione biologica. Risulta particolarmente interessante il fatto che nei prodotti per l'infanzia derivanti da agricoltura a lotta integrata il contenuto di ocratossina A sempre risultato al di sotto del limite di determinazione.

P23. VALUTAZIONE DEL RISCHIO GENOTOSSICO IN AGRICOLTORI ESPOSTI AI PRODOTTI FITOSANITARI

Oliveri F.¹, Hrelia P.², Crosta A.¹, Crosta L.¹, Curione A.¹, Ditta S.¹, Loria G.R.¹, Aiello G.¹, D'Amico R.¹, Grippi F.¹, Gebbia N.¹

¹*Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura, Palermo;* ²*Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna*

L'utilizzo dei prodotti fitosanitari ha contribuito al miglioramento nei rendimenti dei raccolti permettendo un controllo efficiente di erbe infestanti, insetti e microrganismi nocivi. Tuttavia dati sperimentali dimostrano che alcuni principi attivi hanno proprietà tossica e potenzialmente mutagena, in grado di indurre cancerogenesi nell'uomo e negli animali. La nostra indagine è stata condotta nel territorio siciliano, in particolare nella provincia di Ragusa leader, sul territorio nazionale, delle produzioni in serra. Gli obiettivi sono stati quelli di effettuare prevenzione primaria nella popolazione esposta ai prodotti fitosanitari; monitorare attraverso uno studio epidemiologico eventuali modificazioni genetiche; analizzare specifici biomarcatori linfocitari: i micronuclei. La ricerca ha coinvolto 80 soggetti di età compresa tra 24-50 anni, suddivisi in soggetti esposti e non esposti ai prodotti fitosanitari. Un dettagliato questionario è stato distribuito ai soggetti partecipanti alla ricerca, per valutare non solo la presenza di eventuali fattori confondenti e incidenti la risposta genotossica, ma anche per ricevere, nell'ambito dei soggetti esposti, informazioni relative al lavoro svolto in serra (es. tipologia di prodotto fitosanitario utilizzato, modalità di utilizzo dello stesso, possesso del patentino fitosanitario, conoscenza del tempo di decadenza della sostanza in uso, ore lavorative, etc.). Il test utilizzato è quello del micronucleo, eseguito in una coltura di linfociti con la tecnica della citocalasina B (secondo Fenech). I dati ottenuti sono stati comparati applicando il test di Mann-Witney (U-test) e si è potuto rilevare che non esiste differenza significativa, in termini di frequenza di micronuclei, tra il gruppo degli esposti, tutti in possesso del patentino fitosanitario, e quello dei non esposti. Nell'ambito degli esposti emerge una differenza significativa tra fumatori e non fumatori ($P < 0,05$), che non si evince nel gruppo dei non esposti. I risultati ottenuti mettono in evidenza un effetto sinergico tra il fattore fumo e l'esposizione al prodotto fitosanitario.

La ricerca è stata finanziata dall'Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana.

**P24. EFFETTO DEL DIMETILSULFOSSIDO
SULLA NOCICEZIONE *IN VIVO*
E SULL'ACETILCOLINESTERASI CEREBRALE
IN VITRO NEL TOPO**

Pieretti S., Di Giannuario A., Colucci M., Meneguz A.
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il dimetilsulfossido (DMSO) è un solvente ampiamente utilizzato dall'industria chimica e farmaceutica. Sebbene il DMSO non sia utilizzato nelle specialità farmaceutiche, in studi farmacologici esso ha mostrato proprietà analgesiche e antinfiammatorie (Santos e al., 2003). In questo lavoro abbiamo quindi studiato gli effetti della somministrazione locale, sistemica e centrale del DMSO nel modello sperimentale di dolore indotto dalla somministrazione intraplantare di formalina nel topo. La somministrazione locale di DMSO potenzia gli effetti nocicettivi della formalina, in modo dose- e tempo-dipendente. Quando somministrato per via sistemica il DMSO non altera significativamente la risposta alla formalina. Il DMSO somministrato per via centrale determina invece una riduzione dose-dipendente degli effetti nocicettivi della formalina. Studi *in vitro* sul sistema colinergico, condotti utilizzando omogenati di cervello murino, hanno inoltre messo in evidenza per il DMSO un effetto anticolinesterasico dose-dipendente su entrambe le isoforme molecolari G₁ e G₄ dell'acetilcolinesterasi. Tali risultati preliminari suggeriscono un potenziale effetto neurotossico del DMSO, che necessita comunque di studi ulteriori con altri modelli sperimentali.

P25. RUOLO DEL DANNO AL DNA NELLA RISPOSTA CITOTOSSICA INDOTTA DA TOSSINE RIBOSOMIALI IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE IN COLTURA

Sestili P.^{1,2}, Martinelli C.^{1,2}, Carnicelli D.³, Alfieri R.⁴, Petronini P.G.⁴, Brigotti M.³

¹Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino;

²Istituto di Ricerca sull'Attività Motoria, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino;

³Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università degli Studi di Bologna; ⁴Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Patologia Molecolare e Immunologia, Università degli Studi di Parma

Le Shiga tossine 1 e 2 (Stx1 e Stx2, ribotossine) prodotte da alcuni ceppi di *Escherichia coli* rivestono un ruolo importante nella patogenesi di due malattie umane sostenute da questi batteri: la colite emorragica e la sindrome uremico-emolitica. Le Stx 1 e 2 sono glicosilasi che inattivano i ribosomi eucariotici rimuovendo una specifica adenina dell'RNA 28S della subunità maggiore del ribosoma. Questa stessa regione ribosomiale viene colpita anche da alcune ribotossine fungine come l' α -sarcina, prodotta dalla muffa *Aspergillus giganteus*. In questo caso però, la lesione ribosomiale avviene a un nucleotide di distanza e comporta la rottura diretta del filamento di RNA (attività ribonucleasica). Di recente è stato dimostrato che la Stx1 è in grado di rimuovere adenina anche dal DNA in cellule endoteliali umane in coltura (HUVEC): infatti nelle cellule intossicate oltre al blocco della traduzione, si osserva, nel DNA nucleare, l'accumulo di siti apurinici e conseguenti interruzioni a singolo filamento. Nessun dato è disponibile per la Stx2 che risulta essere clinicamente più rilevante della Stx1. Questa ricerca è stata intrapresa per verificare l'eventuale attività genotossica della Stx2 (caratterizzata da meccanismo d'inattivazione ribosomiale identico alla Stx1) nonché quella dell' α -sarcina (che similmente inattiva i ribosomi, ma con meccanismo diverso), e per chiarire il ruolo dell'attività genotossica delle tossine ribosomiali nella risposta apoptotica di cellule intossicate. I dati ottenuti possono essere così riassunti: i) le tre tossine inibiscono con pari efficacia la sintesi proteica; ii) esse sono in grado di indurre lesioni al DNA *in vitro* compatibili col loro meccanismo enzimatico d'azione iii) Stx1 e Stx2 inducono un significativo e quantitativamente simile livello di lesioni al DNA (valutate mediante la tecnica del "fast halo assay") in cellule HUVEC. L' α -sarcina, al contrario, non induce alcun tipo di danno al DNA nelle stesse cellule, probabilmente per l'incapacità di penetrare il nucleo; iv) le due tossine batteriche promuovono una estesa risposta apoptotica successiva sia all'inibizione della sintesi proteica che all'induzione del danno al DNA, mentre l' α -sarcina - alle condizioni utilizzate in questo studio - non induce tale tipo di morte cellulare. I dati ottenuti suggerirebbero quindi che la genotossicità peculiare delle due ribotossine batteriche - e non dell' α -sarcina - legata alla loro attività glicosilasica e alla capacità di penetrare il nucleo, rappresenti un importante meccanismo in grado di contribuire alla massiva delezione cellulare osservata nel nostro sistema nonché, presumibilmente, un non secondario meccanismo patogenetico nelle infezioni sostenute da ceppi batterici di interesse clinico.

Progetto finanziato con fondi COFIN 2004 (P.S.)

P26. FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEI LINFOCITI DEL SANGUE PERIFERICO DI PAZIENTI CON CIRROSI EPATICA DI ORIGINE VIRALE O DA BEVANDE ALCOLICHE

Sumberaz A.², Mattioli F.¹, Grossi S.², Garbero C.¹, Gosmar M.¹, Manfredi V.¹, Testino G.², Martelli A.¹

¹Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Clinica, Università degli Studi di Genova; ²S.S. Gastroenterologia Ospedale S. Martino di Genova

Come è noto, lo sviluppo di un epatocarcinoma può verificarsi nei pazienti con cirrosi epatica sia di origine virale che da bevande alcoliche, ma resta da stabilire se sia di origine epigenetica o conseguenza di un danno genetico. Alcuni recenti studi hanno messo in evidenza la presenza di lesioni del DNA e di aberrazioni cromosomiche nei linfociti del sangue periferico di pazienti con cirrosi epatica di origine virale, attribuendole sia a replicazione del virus nei linfociti, sia alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno nelle cellule di Kupffer. Poiché l'alcool determina uno stress ossidativo, e quindi la formazione di radicali liberi dell'ossigeno, si è ritenuto interessante confrontare la frequenza di lesioni del DNA nei linfociti del sangue periferico di due gruppi di pazienti affetti rispettivamente da cirrosi epatica di origine virale e di origine alcolica, paragonandola a quella presente in un gruppo di volontari sani. Il grado di frammentazione del DNA è stato valutato mediante il Comet Assay che fornisce due indici della frequenza di rotture della singola elica e di siti alcali-labili: la lunghezza della coda (LC) e il momento della coda (MC). In 10 volontari sani i valori della media \pm DS sono risultati per LC 1,20 \pm 0,31 (range 0,79-1,66) e per MC 111 \pm 27 (range 69-151). In entrambi i gruppi di pazienti cirrotici si è constatato un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) della frequenza di lesioni del DNA. Infatti in 15 pazienti con cirrosi epatica da HCV LC e MC sono rispettivamente risultati 2,49 \pm 0,48 (range 1,96-3,50) e 200 \pm 39 (range 142-287), ossia aumentati del 108% e dell'80%; in 12 pazienti con cirrosi alcolica LC e MC erano rispettivamente 2,59 \pm 1,79 (range 1,27-8,10) e 231 \pm 160 (range 130-715) ossia aumentati del 116% e del 108%. È interessante aggiungere che in entrambi i gruppi di pazienti cirrotici la frequenza di lesioni del DNA è risultata sostanzialmente proporzionale al Child-Pugh Score, ossia all'indice abitualmente utilizzato per quantificare la gravità dell'insufficienza epatica. In conclusione, la riscontrata presenza di lesioni del DNA nei linfociti dei due gruppi di pazienti cirrotici suggerisce un effetto genotossico diretto sia del virus HCV che dell'alcool, e induce a ritenere che lo stesso effetto genotossico si manifesti nel fegato e contribuisca all'epatocarcinogenesi.

P27. EFFETTI DEL CONTAMINANTE ALIMENTARE SEMICARBAZIDE IN RATTI SPRAGUE-DAWLEY DURANTE LO SVILUPPO PREPUBERALE: DATI PRELIMINARI

Tassinari R.¹, Macrì C.¹, Moracci G.¹, Lagatta V.¹, Eusepi A.², Di Virgilio A.², Ricceri L.³, Calamandrei G.³, Mantovani A.¹, Maranghi F.¹

¹Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Servizio Biologico Gestione Sperimentazione Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione. In alimenti conservati in vasetti di vetro con coperchi metallici – come omogeneizzati, succhi di frutta, etc. – è stata rilevata un'idrazina, la semicarbazide (SEM), formata in seguito a pastorizzazione dall'azodicarbonamide, composto approvato dalla UE come sigillante. Considerando l'esposizione dei bambini e la carenza di dati sugli effetti su crescita e sviluppo, il lavoro valuta la potenziale tossicità della SEM sul ratto nella fase prepuberale di sviluppo. *Materiali e metodi.* Ratti al giorno post-natale PN 22-23 (svezzamento) vengono trattati per 28 giorni con dosi di 0, 40, 75, 140 mg/kg/pc/die di SEM e sacrificati a maturità sessuale (PN 60). *Parametri registrati:* peso, consumo di mangime, parametri di sviluppo sessuale, test neurocomportamentali. Prelievi e pesi di vari organi per esame istologico, sangue per il bilancio estrogeni/androgeni. *Risultati.* *Tossicità generale:* 140 mg/kg/pc/die - significativa riduzione di peso e consumo di mangime; 75 e 40 mg/kg/pc/die - significativa riduzione, durante la somministrazione, del peso dei maschi e un aumento del consumo di mangime nelle femmine. 140 e 75 mg/kg/pc/die: mortalità del 20% con deperimento, linfonodi ingrossati e sversamenti sierosi articolari. *Peso degli organi.* 140 mg/kg/pc/die - significativo aumento nei maschi del peso relativo di testicoli e milza; nelle femmine del peso relativo di fegato e timo. I pesi assoluti, tranne la milza, diminuiscono. 75 e 40 mg/kg/pc/die - nei maschi significativa riduzione del peso relativo della milza, nelle femmine del fegato. Il peso relativo del timo aumenta nelle femmine a 75, nei maschi a 40 mg/kg/pc/die. *Sviluppo sessuale:* alta dose, ritardo significativo dell'apertura vaginale e del distacco del prepuzio. 75 e 40 mg/kg/pc/die: anticipo del distacco del prepuzio. Nessun effetto sul peso relativo dell'utero. *Test neurocomportamentali:* a 140 mg/kg/pc/die diminuita esplorazione nel test di open field [diminuita attività locomotoria ($p < 0,05$) e diminuita frequenza di risposte di wall rearing (esplorazione delle pareti dell'arena sperimentale) ($p < 0,05$)]. I dati a 75 e 40 mg/kg/pc/die sono in studio. *Conclusioni.* Ad alta dose la SEM provoca tossicità generale; l'effetto sul peso degli organi può rappresentare indirettamente un effetto sulla crescita. Alle dosi inferiori, le variazioni del peso relativo degli organi può indicare una tossicità specifica, da approfondire con l'istologia; alle stesse dosi, viene suggerito un possibile effetto antiestrogenico e/o proandrogenico, supportato da dati preliminari; l'assenza di alterazioni del peso relativo dell'utero escluderebbe un effetto antiestrogenico diretto. I possibili effetti neurocomportamentali saranno confermati dai dati ai livelli di dose inferiori. Tali risultati preliminari suggeriscono una differente suscettibilità nei sessi.

Progetto di ricerca finalizzato “Analisi del rischio correlato alla presenza dei residui negli alimenti di origine animale” (4AF/F3).

Si ringrazia la Sig.ra Francesca Baldi per la collaborazione nella realizzazione grafica.

P28. EFFETTI CITOTOSSICI DELL'ANFIBOLO FIBROSO FLUORO-EDENITE SU CELLULE EPITELIALI POLMONARI UMANE *IN VITRO*

Travaglione S.¹, Falzano L.¹, Filippini P.², Fabbri A.¹, Bruni B.M.², Paoletti L.², Fiorentini C.¹
¹*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ²*Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Un'indagine epidemiologica condotta in Italia sulla mortalità per neoplasie pleurali maligne ha evidenziato un considerevole numero di casi a Biancavilla, una località situata nella zona vulcanica della Sicilia orientale. Nessuno di tali pazienti era stato esposto durante la vita professionale all'asbesto, una delle principali cause di mesotelioma. Gli studi mineralogici effettuati nella zona hanno portato all'identificazione di un nuovo anfibolo con morfologia asbestiforme, prismatico, aciculare o fibroso: la fluoro-edenite.

Recentemente, è stato riportato come la fluoro-edenite fibrosa sia altamente tumorigenica nei ratti. Al fine di acquisire più dettagliate informazioni sulla possibile relazione causale tra esposizione a questo materiale e cancerogenesi, abbiamo analizzato gli effetti indotti dalle fibre di fluoro-edenite *in vitro*, utilizzando come sistema modello una linea di cellule epiteliali polmonari umane, le A549. I risultati ottenuti hanno evidenziato come le fibre di fluoro-edenite inducano nelle cellule A549 una consistente riorganizzazione del citoscheletro di actina che determina, a sua volta, un allargamento ("spreading") della cellula sul substrato, un notevole ingrandimento del corpo cellulare e blocco della citodieresi con conseguente formazione di cellule giganti multinucleate. Tali policarioni non mostrano tuttavia alcun difetto evidente nella progressione del ciclo cellulare, continuano a dividersi e non vanno incontro ad apoptosi, suggerendo l'induzione di un fenotipo trasformato. Inoltre, il trattamento con la fluoro-edenite promuove il rilascio di citochine pro-infiammatorie, quali l'IL-6 e l'IL-8. Anche quest'ultimo dato supporta la relazione tra esposizione alle fibre e cancerogenesi, se si considera la stretta connessione esistente tra infiammazione cronica e alcuni tipi di tumori. Tali risultati sono comparabili a quelli ottenuti nella stessa linea cellulare dalla crocidolite, utilizzata come controllo positivo, uno dei più caratterizzati anfiboli asbestiformi e la cui relazione con l'infiammazione cronica e il cancro è ben nota. In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che la fluoro-edenite fibrosa possa rappresentare un potenziale agente "trasformante" per le cellule polmonari umani.

P29. STUDIO SUGLI EFFETTI BIOLOGICI *IN VIVO* E *IN VITRO* DELLE YESSOTOSSINE

Tubaro A.¹, Sosa S.¹, Soranzo M.R.², Lorenzon P.², Decorti G.³, Giangaspero A.¹, Yasumoto T.⁴

¹Dipartimento dei Materiali e delle Risorse Naturali, Università degli Studi di Trieste;

²Dipartimento di Fisiologia e Patologia, Università degli Studi di Trieste; ³Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Trieste; ⁴Japan Food Research, Tama Laboratory, Tokyo

Le yessotossine (YTXs) sono composti polieterei di origine algale che, accumulandosi nei molluschi, possono essere assunti dall'uomo. Poiché erano spesso rilevate insieme alle altre tossine lipofile, quali acido okadaico e pectenotossine, esse furono inizialmente incluse nel gruppo delle tossine diarroiche DSP (Diarrhoeic Shellfish Poisoning). Contrariamente all'acido okadaico, tuttavia, le yessotossine non provocano diarrea, né sono letali *per os* nel topo, anche se rimane ancora da definire il loro potenziale tossicologico. Studi recenti hanno evidenziato che la YTX (1 e 2 mg/kg) e i suoi analoghi omoYTX (1 mg/kg) e 45-idrossi-omoYTX (1 mg/kg), somministrati *per os* (in dose singola oppure ripetuta giornalmente per 7 giorni a topi CD-1 femmine) hanno indotto lievi alterazioni ultrastrutturali (assembramento di mitocondri rigonfi e rotondeggianti) nelle cellule miocardiche pericapillari. Analoghe modificazioni erano state evidenziate *in vitro*, in mitocondri isolati di fegato e in una linea cellulare epatica, in cui la YTX, a concentrazioni nanomolari, induceva l'apertura dei pori di transizione della membrana mitocondriale interna. Dopo somministrazione orale, acuta o ripetuta giornalmente per una settimana nel topo, la YTX (1 e 2 mg/kg), l'omoYTX (1 mg/kg) e la 45-idrossi-omoYTX (1 mg/kg) non hanno invece provocato alcuna alterazione nei mitocondri epatici. Vista l'assenza di effetti *in vivo* a livello epatico, si è ipotizzata un'azione selettiva a livello dei tessuti contrattili. È stato quindi valutato l'effetto di tali composti sulle cellule muscolari scheletriche. In particolare, considerando il ruolo dei mitocondri nel controllo omeostatico degli ioni Ca^{++} nelle cellule, mediante tecniche di "videoimaging", è stato verificato l'effetto *in vitro* di YTX, omoYTX e 45-idrossi-omoYTX sulla concentrazione intracellulare di ioni Ca^{++} . Nessuna tossina, alla concentrazione di 1 μM , è stata in grado di indurre variazioni significative dei livelli intracellulari di ioni Ca^{++} nelle cellule muscolari scheletriche, né ha modificato l'eccitabilità della membrana cellulare. Analogamente, la somministrazione orale delle tossine nel topo non ha provocato danni ultrastrutturali nei mitocondri delle cellule muscolari scheletriche. Poiché si può ipotizzare che le yessotossine agiscano in maniera specifica a livello delle cellule muscolari cardiache, sono in corso esperimenti su colture primarie di miocardiociti mediante tecniche di "videoimaging", atti a verificare se tali tossine influenzano i livelli intracellulari di ioni Ca^{++} e/o l'eccitabilità di membrana.

P30. STUDI *IN VITRO* SULL'OMEOSTASI DELL'OSSIDO NITRICO NEL LUME GASTRO-INTESTINALE. RUOLO DEGLI ANTIOSSIDANTI POLIFENOLICI

Turco L.¹, Peri L.², Pietraforte D.², Samoggia P.², Stammati A.¹, Minetti M.²

¹Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze Istituto Superiore di Sanità, Roma

I nitrati assunti con la dieta vengono metabolizzati a nitriti (NO_2^-) dalla flora batterica presente nella saliva e a pH 1-2 dello stomaco sono presenti come acido nitroso (HNO_2) in equilibrio con il radicale $\bullet\text{NO}$ e le specie nitrosanti/nitranti (N_2O_3 e $\bullet\text{NO}_2$). Pur esercitando nel lume gastrico effetti benefici, il radicale $\bullet\text{NO}$ sembra avere delle implicazioni sull'alta incidenza di neoplasie epiteliali a livello della giunzione gastro-esofagea (nitrosamine). Lo scopo di questo studio è la messa a punto di un modello *in vitro* rappresentativo del tratto gastro-intestinale per indagare sull'influenza degli antiossidanti assunti con la dieta nell'omeostasi gastrica del radicale $\bullet\text{NO}$. È stata utilizzata per questo scopo la linea cellulare umana Caco-2/TC7 che deriva da un tumore del colon; le cellule sono state usate in sospensione all'interno di un capillare di Teflon gas-permeabile immerso in saliva acida contenente nitriti, con e senza due polifenoli di cui la dieta di tipo mediterraneo risulta essere particolarmente ricca: l'acido clorogenico (CA) e l'acido ascorbico (AA). In queste condizioni sperimentali, il radicale $\bullet\text{NO}$ prodotto nella soluzione acida di nitriti, dopo aver attraversato il capillare, è stato quantificato all'interno delle cellule mediante tecniche biochimiche e citofluorimetriche. I risultati hanno rivelato che il sistema sperimentale utilizzato è in grado di riprodurre l'omeostasi gastrica del radicale $\bullet\text{NO}$ descritta *in vivo*, presentando gli stessi equilibri tra le specie reattive dell'azoto. È stato inoltre osservato che il radicale $\bullet\text{NO}$ prodotto penetra all'interno della cellula e che la presenza di CA ne induce un aumento non osservato con AA il quale d'altro canto non sembra avere alcun effetto di scavenging delle specie NOx. Questi risultati pongono nuovi interrogativi sull'influenza di una dieta ricca di fenoli sull'omeostasi del radicale $\bullet\text{NO}$ a livello del lume gastrico e l'approccio sperimentale adottato può fornire preliminari informazioni sugli equilibri tra le varie specie chimiche implicate, presentando in tal senso i vantaggi di un sistema sperimentale semplificato utile per una migliore interpretazione dei risultati e valido come base per indirizzare in maniera più mirata ulteriori studi in sistemi più complessi.

P31. SVILUPPO DI UN MODELLO MATEMATICO PER VALUTARE GLI EFFETTI *IN VITRO* DELL'ESPOSIZIONE COMBINATA A METIL-MERCURIO E PCB153

Vettori M.V.^{1,2}, Caglieri A.², Goldoni M.^{1,2}, Poli D.^{1,2}, Folesani G.^{1,2}, Ceccatelli S.³, Mutti A.²
¹Centro Studi e Ricerche ISPEL, Università degli Studi di Parma; ²Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università degli Studi di Parma; ³Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology and Neurotoxicology, Karolinska Institutet, Stockholm

Background: La valutazione degli effetti provocati dall'esposizione a miscele di sostanze tossiche ambientali risulta in molti casi di difficile analisi e comprensione. Benché l'uso di queste sostanze sia rigidamente controllato e regolamentato, la presenza di residui tossici in grado di accumularsi nel cibo rappresenta tuttora un possibile rischio di esposizione per l'uomo. *Scopo:* In questo studio sono stati analizzati gli effetti combinati dell'esposizione a due composti neurotossici, il metil-mercurio (Me-Hg) e un isomero non planare della famiglia dei policlorobifenili (PCB 153), sostanze in grado di accumularsi nel cibo, soprattutto pesce. Gli esperimenti sono stati effettuati su una linea cellulare neuronale dopaminergica di ratto (PC12).

Metodi: le cellule sono state inizialmente esposte per 24 ore ai composti puri (Me-Hg, intervallo di concentrazione: 1e-7 – 4e-6; PCB153, intervallo di concentrazione: 1e-5- 4e-4). In seguito, sono stati valutati gli effetti dopo trattamento con diverse combinazioni dei due composti in esame. Al termine dell'incubazione, la vitalità cellulare è stata misurata mediante il saggio dell'MTT e i dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando un modello matematico basato sul criterio di additività di Loewe. Mediante tale approccio è stato possibile stabilire la significatività delle differenze tra i valori osservati e attesi ed è stato possibile stabilire il tipo di interazione tra le due sostanze. Le combinazioni di concentrazioni più significative sono state utilizzate per monitorare gli effetti su altri parametri di tossicità quali la perossidazione dei lipidi di membrana (TBARS, indicatori di stress ossidativo) e i livelli intra-cellulari di dopamina.

Risultati: Per particolari combinazioni di concentrazioni (Me-Hg 5e-7 M e PCB153 1e-4 e 2e-4 M; Me-Hg 1e-6 M e PCB153 5e-5 M; Me-Hg 1e-7 M e PCB153 4e-4 M) è stato evidenziato un effetto anatagonistico tra i due composti in esame. Tali effetti sono stati confermati dall'analisi dei livelli di TBARS e della dopamina intra-cellulare. *Conclusioni:* Il modello matematico utilizzato rappresenta uno strumento per comprendere maggiormente l'interazione tra Me-Hg e PCB 153 *in vitro* e più in generale per valutare gli effetti di miscele di sostanze tossiche.

Questa ricerca è stata finanziata dal progetto europeo DEVNERTO (FOOD-CT-2003-506143).

P32. APOPTOSI CARDIACA E VARIAZIONE DEI TEMPI DI ESPOSIZIONE ALLA DOXORUBICINA

Vitelli M.R., Piegari E., Rodolico G., Caserta S., Fuccio C., Capuano M., Oliva P., Rossi F., Berrino L.

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Divisione di Farmacologia L. Donatelli, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli

Recenti studi hanno dimostrato che l'apoptosi dei cardiomiociti svolge un ruolo importante nello scompenso cardiaco indotto dalla doxorubicina (DOX). E' noto che il rischio di cardiotoxicità da DOX e' inversamente correlato ai tempi di somministrazione della dose cumulativa. Pertanto, obiettivo del nostro studio è stato quello di stabilire se la variazione dei tempi di esposizione alla stessa dose cumulativa di DOX è in grado di influenzare l'apoptosi cardiaca nel ratto. Sono stati costituiti 3 gruppi sperimentali di n. 20 ratti Wistar ciascuno a cui e' stata somministrata, in tempi diversi, una dose di DOX pari a 20 mg/kg per via intraperitoneale. In particolare: il I gruppo è stato trattato con DOX 5 mg/kg/die quattro volte alla settimana per una settimana; il II gruppo con DOX 2,5 mg/kg/die quattro volte alla settimana per due settimane; il III gruppo con DOX 1,25 mg/kg/die quattro volte alla settimana per quattro settimane. Per ognuno dei 3 gruppi trattati (TRT), e' stato costituito un gruppo controllo (CTL) di n. 10 animali a cui e' stata somministrata una soluzione fisiologica per via intraperitoneale. Alla fine dei trattamenti, gli animali sono stati sacrificati ed è stato esciso il cuore. Sull'omogenato cardiaco e' stata eseguita un'analisi dell'espressione proteica mediante Western Blotting. L'analisi dell'espressione proteica ha evidenziato che:

- DOX 5 mg/kg/die ha determinato un aumento significativo ($p < 0,05$) dei livelli di espressione del *ratio* Bax/Bcl2 (TRT $0,2 \pm 0,01$ vs CTL $0,08 \pm 0,02$) e di: a) procaspasi 3 (TRT $3,9 \pm 0,2$ vs CTL $2,8 \pm 0,13$) e della sua forma clivata (TRT $2,5 \pm 0,1$ vs CTL $1,6 \pm 0,07$); b) procaspasi 12 (TRT $6,83 \pm 0,3$ vs CTL $4,31 \pm 0,4$) e della sua forma clivata (TRT $8,82 \pm 1,15$ vs CTL $0,23 \pm 0,11$); c) procaspasi 8 (TRT $3,3 \pm 0,1$ vs CTL $2,6 \pm 0,2$).

- DOX 2,5 mg/kg/die ha determinato un aumento significativo ($p < 0,05$) dei livelli di espressione di procaspasi 12 (TRT $7,95 \pm 0,1$ vs CTL $4,83 \pm 0,53$).

- DOX 1,25 mg/kg/die non ha determinato variazioni significative dei livelli di espressione delle proteine ad azione pro- e antiapoptotica.

In conclusione, la somministrazione di una dose cumulativa di DOX pari a 20 mg/kg in quattro settimane ha indotto minori effetti apoptotici rispetto alla stessa dose somministrata in tempi più brevi. Ciò potrebbe fornire ai clinici utili indicazioni circa l'impiego di uno schema di trattamento dotato di massima efficacia e minori effetti tossici. Tuttavia, ulteriori studi sono in corso per chiarire tali meccanismi.

P33. INDUZIONE DI SENESCENZA PRECOCE IN FIBROBLASTI UMANI WI38 DOVUTA A RADIAZIONI ULTRAVIOLETTE: RUOLO DI AKT

Vona R., Gambardella L., Ascione B., Matarrese P., Malorni W., Straface E.
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

È noto che dosi citotossiche di UVB possono innescare, in molte linee cellulari, una serie di processi ossidativi che portano alla condensazione della cromatina con conseguente morte cellulare per apoptosi. Nel nostro lavoro invece abbiamo osservato che esponendo fibroblasti umani non trasformati (WI38) a UVB (1200Jm²), si manifestavano una serie di eventi quali: i) cambiamenti della morfologia (cioè perdita di polarità e aumento di volume); ii) arresto del ciclo cellulare nella fase G0/G1; iii) aumento dell'attività dell'enzima β-galattosidasi; nonché iv) presenza nel nucleo di strutture di eterocromatina riarrangiate; tutti segni caratteristici di cellule senescenti. La senescenza prematura è una via alternativa alla morte cellulare che le cellule seguono dopo trattamenti con chemioterapici, H₂O₂ oppure in seguito a deprivazione di siero. Al fine di caratterizzare questo fenomeno e di identificare i pathways in esso coinvolti, abbiamo condotto una serie di studi biochimici e molecolari che ci hanno permesso di identificare le proteine chiave nella comparsa del fenotipo senescente. In primis abbiamo studiato l'espressione di proteine quali la survivina, Bcl-2 e p66-SHC, coinvolte nella sopravvivenza cellulare, trovando una loro "up-regulation" nelle cellule senescenti rispetto ai controlli; successivamente abbiamo verificato lo stato di attivazione di Akt e del fattore di trascrizione NF-κB, noti per essere regolatori di vari eventi cellulari quali a esempio aumento di volume, proliferazione, differenziazione, migrazione e sopravvivenza. Un'ulteriore conferma del ruolo svolto da Akt nel fenomeno della senescenza deriva dall'impiego della Wortmanina, un'inibitore di PI3k, una chinasi responsabile dell'attivazione di Akt. Infatti, trattando i fibroblasti con Wortmanina prima dell'esposizione agli UVB, il pathway PI3k/Akt veniva bloccato e le cellule invece di "invecchiare" morivano per apoptosi. Sulla base dei dati ottenuti, possiamo dire che quando una cellula viene esposta a UVB può seguire due strade: morire per apoptosi o sopravvivere invecchiando.

P34. POSSIBILE MODULAZIONE DELLA RISPOSTA INDIVIDUALE AL DANNO AL DNA DA PARTE DEL POLIMORFISMO DI MDM2, UN REGOLATORE DI P53

Zijno A., Marcon F., Siniscalchi E., Mazzoli E., Crebelli R.
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La risposta individuale agli effetti genotossici degli xenobiotici e il conseguente rischio di cancro legato all'esposizione a questi agenti, è influenzata dal background genetico. La presenza di polimorfismi genetici coinvolti sia nel metabolismo degli xenobiotici che nella risposta cellulare al danno indotto contribuisce a determinare il rischio individuale. Il soppressore tumorale p53 è mutato in diversi tipi di tumore ed è implicato nei processi di riparazione del DNA, nel controllo del ciclo cellulare e nella risposta apoptotica in risposta al danno sul DNA. È perciò ragionevole pensare che polimorfismi comuni nei geni coinvolti nel pathway di attivazione di p53 possano influenzare la suscettibilità individuale al cancro. Al riguardo è stato individuato un polimorfismo per un singolo nucleotide (SNP309) nel promotore del gene *MDM2*, un regolatore negativo di p53, che ne determina un'aumentata espressione e conseguente attenuazione del pathway di p53. Nell'uomo SNP309 si è trovato associato alla precoce comparsa di alcune forme tumorale, mentre linee cellulari omozigoti per SNP309 hanno mostrato una risposta anormale al danno indotto da agenti genotossici. Per verificare se la presenza di questo polimorfismo possa influenzare la risposta individuale al danno genotossico, 66 soggetti, inseriti in uno studio sulla familiarità per il cancro gastrico, sono stati genotipizzati per *MDM2* 309. Su tutti i soggetti è stata valutata la suscettibilità agli effetti genotossici determinando la frequenza di micronuclei nei linfociti di sangue periferico dopo trattamento con 2 Gy di raggi gamma. Per la caratterizzazione del genotipo in *MDM2* 309 è stato individuato un sito di restrizione per *MspA1 I*, presente solo nell'allele mutato, in grado di discriminare i due alleli dopo elettroforesi in base al numero e alla lunghezza dei frammenti generati. Le distribuzioni genotipiche in *MDM2* 309 sono risultate il 29%, 60% e 11% rispettivamente per omozigoti wild type, eterozigoti e omozigoti varianti, in accordo con quanto già pubblicato e in equilibrio di H.-W., confermando la validità del sistema messo a punto. a ulteriore conferma sono attualmente in corso verifiche del genotipo mediante sequenziamento. L'analisi citogenetica non ha mostrato nessun effetto del polimorfismo di *MDM2* 309 sui livelli basali di micronuclei, mentre dopo irraggiamento si è osservato una riduzione del numero di micronuclei negli eterozigoti rispetto ai wild type e una riduzione più marcata nei soggetti omozigoti varianti. Questi risultati sono attualmente in valutazione in relazione al possibile meccanismo di azione di *MDM2* e all'interazione con altri fattori di suscettibilità.

8 FEBBRAIO 2006

P35. EFFETTO DEI POLIMORFISMI DEL GENE XPD SUL DANNO GENOTOSSICO BASALE E INDOTTO DALLA NITROSAMINA TABACCO-SPECIFICA NNK

Affatato A.A.^{1,2}, Cantelli Forti G.^{1,2}, Abdel-Rahman S.Z.², Legator M.S.²

¹*Dipartimento di Farmacologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna;*

²*Department of Preventive Medicine and Community Health, Division of Environmental Toxicology, University of Texas Medical Branch, Galveston*

Il riparo del DNA gioca un ruolo critico nel proteggere il genoma da insulti di diversa natura come a esempio gli agenti cancerogeni presenti nel fumo di sigaretta. Studi epidemiologici hanno messo in evidenza come due polimorfismi nel gene di riparo XPD (Asp312Asn nell'esone 10 e Lys751Gln nell'esone 23) possano essere coinvolti in alcuni tipi di cancro, prevalentemente quelli cutanei, polmonari e altri associati al fumo, anche se il loro ruolo funzionale non è ancora chiaro. La nitrosamina 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) è uno dei più potenti agenti cancerogeni presenti nel fumo di sigaretta, in grado di indurre addotti a DNA, stress ossidativo e aberrazioni cromosomiche (CA). La frequenza di CA in linfociti è un importante biomarcatore per il rischio di cancro nell'uomo, riflettendo effetti biologici precoci di esposizione a cancerogeni genotossici, suscettibilità e capacità di riparo del DNA individuale. A tale scopo, si è valutata la relazione tra i polimorfismi in XPD e la risposta genotossica, misurata come frequenza di CA, basale e indotta da NNK. La popolazione in studio consisteva in un gruppo di 65 volontari, 30 maschi e 35 femmine, reclutati tra studenti e lavoratori presso il campus della University of Texas Medical Branch in Galveston, Texas, USA. Tramite un prelievo di sangue periferico, si è proceduto alla genotipizzazione della popolazione mediante tecniche PCR-RFLP. I linfociti ottenuti da un ulteriore campione di sangue sono stati aliquotati o per esporli al cancerogeno (NNK) o utilizzati come riferimento (basali). Si è quindi determinata la frequenza delle CA. A livello basale, si è osservato un incremento di 2,57 volte nel rischio di elevate CA associate con la variante 312Asn (95% CL=0,88-7,50; p=0,1). Il rischio relativo è più pronunciato nei fumatori (OR=4,67; 95%CL=1,04-20,90; p=0,04) e nei soggetti oltre i 48 anni (OR=7,33; 95%CL=1,53-35,10; p=0,01). Analogamente, in seguito a esposizione a NNK, si è osservata una associazione significativa tra l'aumento delle aberrazioni cromosomiche indotte da NNK e la presenza dell'allele 312Asn (OR=3,69; 95%CL=1,29-10,56; p=0,02). Il rischio è più alto nei fumatori (OR=4,62; 95%CL=1,14-18,70; p=0,04) e nei soggetti oltre i 48 anni (OR=5,76; 95%CL=1,30-25,41; p=0,03). Nessun effetto significativo è stato, invece, osservato per la presenza dell'allele variante 751Gln. Questi dati suggeriscono che il polimorfismo Asp312Asn potrebbe avere un significato funzionale e/o strutturale per la proteina XPD, risultando in una alterata capacità di riparo del DNA.

P36. POLIMORFISMI IN GENI DEI SISTEMI DI RIPARAZIONE DEL DNA, GENOTOSSICITÀ E RADIOSENSIBILITÀ

Angelini S.^{1,2}, Carbone F.¹, Kumar R.², Maffei F.¹, Cantelli Forti G.¹, Hemminki K.², Hrelia P.¹

¹*Dipartimento di Farmacologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna;*

²*Divisione di Epidemiologia Molecolare, German Cancer Research Center, Heidelberg*

Negli ultimi anni lo studio degli effetti indotti dall'esposizione a radiazioni ionizzanti [RI] ha ricevuto un crescente interesse, dato il grande impiego di metodi radiologici nell'industria e in campo biomedico. Senza dubbio, i tumori associati alle RI rappresentano i danni biologici che suscitano maggior preoccupazione e per i quali sono necessari specifici programmi di intervento. La ricerca è stata condotta mediante un approccio sperimentale integrato che ha valutato biomarcatori di effetto e di suscettibilità su una popolazione di 21 medici radiologi, esposti professionalmente a RI, e 49 soggetti di controllo non esposti professionalmente, appaiati per sesso, età e fumo al gruppo degli esposti. In particolare, abbiamo valutato l'influenza di polimorfismi in geni dei sistemi di riparazione del DNA su effetti genotossici e radiosensibilità a seguito del trattamento con Bleomicina *in vitro* (BLM). Il danno al DNA è stato valutato con il test del micronucleo (MN) in linfociti di sangue periferico. Polimorfismi nei geni dei sistemi di riparazione del DNA *XRCC1*, *XRCC3*, e *XPB* sono stati valutati tramite la reazione di PCR, combinata con analisi mediate enzima di restrizione. Il test del MN ha evidenziato un incremento statisticamente significativo del danno nei soggetti esposti rispetto ai soggetti di controllo [6,27±2,69 vs 8,62±2,80; $p=0,001$]. Il trattamento con BLM ha causato un incremento statisticamente significativo della frequenza di MN nel gruppo degli esposti rispetto al gruppo di controllo [13,6±4,81 vs 18,0±2,78, $p=0,0002$]. La variabilità inter-individuale osservata a seguito del trattamento con BLM sembra essere modulata, seppure non significativamente, dai polimorfismi nei geni *XRCC1*, *XRCC3*, e *XPB*. Questo lavoro preliminare mette in evidenza l'esistenza di un rischio genetico associato all'esposizione cronica a basse dosi di RI. Inoltre, fattori genetici possono in parte spiegare la suscettibilità individuale all'esposizione a RI e il conseguente rischio di sviluppare patologie degenerative, quali le neoplasie. Sulla base dei risultati a ora ottenuti si può concludere che l'analisi integrata di biomarcatori di effetto e di suscettibilità può contribuire alla stima del rischio derivante dall'esposizione a RI e può considerarsi un valido approccio da inserire nei programmi di radioprotezione. Inoltre, l'analisi di interazioni gene-gene e aplotipi combinata con test di sensibilità mutagenica rappresenta un approccio significativo allo studio della suscettibilità genetica. Per verificare pienamente questa ipotesi, lo studio sta proseguendo secondo un preciso disegno sperimentale che prevede l'arruolamento di una più ampia popolazione, sia di esposti professionalmente a RI che di soggetti di controllo.

P37. EPIDEMIA DI INTOSSICAZIONI DA COCAINA TAGLIATA CON ATROPINA

Bacis G.¹, Papa P.², Rocchi L.², Nerini T.², Faraoni L.¹, Farina M.L.¹

¹*Centro Antiveleni, Ospedali Riuniti di Bergamo;* ²*Laboratorio di Tossicologia Analitica Clinica, IRCCS, Policlinico San Matteo, Pavia*

Le sostanze farmacologicamente attive aggiunte nelle droghe d'abuso come sostanza da taglio rappresentano un fenomeno comunemente noto. In questo contesto, tuttavia, un'epidemia di intossicazioni dovute a cocaina tagliata con atropina rappresenta per l'Italia un evento nuovo. A partire dal novembre 2004, sino a gennaio 2005, il Centro Antiveleni degli Ospedali Riuniti di Bergamo in collaborazione con il Laboratorio di Tossicologia Analitica Clinica dell'IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, si sono trovati a gestire casi clinici di sospetta overdose da cocaina (anamnesi positiva per abuso di cocaina), caratterizzati da segni e sintomi tipici della sindrome simpaticomimetica ascrivibile allo stupefacente che, per intensità e la presenza di allucinazioni inducevano a ipotizzare anche una sindrome anticolinergica. I pazienti, ricoverati in diversi ospedali delle province di Bergamo e Brescia, presentavano stato confusionale, agitazione, allucinazioni, midriasi areflessica, tachicardia, ipertensione. Le analisi chimico-tossicologiche eseguite su sangue e urine di 30 pazienti sono risultate positive per cocaina in tutti in casi osservati e hanno consentito di rilevare la presenza di atropina in 22 casi. In particolare l'atropina nei campioni biologici databili da 1 a 36 ore dall'intossicazione è risultata presente in tutti i campioni di urina nel range di concentrazioni pari a 0,3 – 38 mcg/ml e in concentrazioni rilevabili dal metodo adottato (>2 ng/ml, gascromatografia-spettrometria di massa) in 13 campioni di siero (range: 3 –16 ng/ml). Il fenomeno, al suo esordio, è stato tempestivamente segnalato agli altri Centri Antiveleni e ai competenti Assessorati della Regione Lombardia, ai servizi SERT delle ASL e ai mezzi di informazione al fine di monitorare in tal modo la diffusione dell'evento. Da tale esperienza è stato predisposto un protocollo operativo per la gestione di situazioni di rischio tossicologico con diffusione epidemica partendo dalla rilevazione di eventi sentinella.

P38. IL LABORATORIO DI TOSSICOLOGIA ANALITICA A SUPPORTO DEL PAZIENTE INTOSSICATO: UTILE, INDISPENSABILE O UN LUSSO?

Baldi M.L., Nerini T., Papa P., Rocchi L., Valli A.

Laboratorio di Tossicologia Analitica Clinica, IRCCS, Policlinico San Matteo, Pavia

La portata del dato chimico-tossicologico per la diagnosi, prognosi e indicazione al trattamento in caso di intossicazione acuta è valutata attraverso la casistica di un laboratorio di Tossicologia, il Laboratorio di Tossicologia Analitica Clinica dell'IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. È stato approntato uno studio retrospettivo di 280 casi di sospetta intossicazione acuta gestiti analiticamente dal Laboratorio al fine di verificare la possibilità di formulare una corretta diagnosi basandosi esclusivamente su dati anamnestici e sintomi e segni clinici ovvero avvalendosi anche del risultato delle indagini chimico-tossicologiche. La casistica esaminata comprende come causa di intossicazione farmaci, stupefacenti, etanolo, pesticidi, solventi e altri prodotti di uso non medicamentoso. La casistica (periodo gennaio-giugno 2005) si riferisce a una utenza principalmente regionale (Lombardia) con un contributo significativo di richieste da parte di ospedali delle regioni limitrofe (Liguria, Piemonte, Emilia Romagna) e occasionali richieste di ospedali situati su tutto il territorio nazionale. È risultato che nel 40% dei casi si è osservata piena corrispondenza tra atteso/sospettato e risultato di laboratorio; nel 4% dei casi, gli esami tossicologici hanno evidenziato come concausa d'intossicazione una o più molecole oltre a quelle segnalate, mentre nella misura del 18% solo alcune tra le molecole segnalate sono risultate effettivamente responsabili del quadro clinico. Inoltre, nell'1% dei casi le positività analitiche riguardavano esclusivamente sostanze diverse da quelle segnalate e nel 9% dei casi il dato di laboratorio ha fornito esito positivo per una più sostanze in assenza di segnalazioni. Nel 23% dei casi si è avuto esito completamente negativo a fronte di uno o più sospetti/segnalazioni e nel 5% l'esito negativo delle indagini di laboratorio riguardavano casi ad anamnesi muta. Da segnalare che il dato tossicologico è intervenuto nel 17% dei casi osservati nella guida al trattamento terapeutico (16% dei casi a supporto del trattamento antidotico e 1% per l'attivazione di interventi invasivi di depurazione). Dai dati riportati si evince che, per la casistica esaminata, la diagnosi fondata esclusivamente su dati anamnestici e clinici sarebbe risultata corretta e completa solo nel 40% dei casi; ne consegue che la qualità della cura del paziente intossicato, i dati epidemiologici delle intossicazioni, le valutazioni a posteriori dell'efficacia di protocolli terapeutici potrebbero essere inficiati da una errata o parziale conoscenza del reale quadro eziologico.

P39. DANNO DA CONDENSATO DI SIGARETTA E EFFETTI NEUROPROTETTIVI ESERCITATI DA MOLECOLE ANTIOSSIDANTI

Bassi A.¹, Russo M.² Martino A.¹, Nunziata A.¹, Di Renzo G.²

¹*Funzione Ricerca, BAT-Italia S.p.A., Napoli;* ²*Divisione di Farmacologia, Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Napoli Federico II*

Il condensato di sigaretta (CSC) è costituito da una miscela di circa 4.800 composti chimici molti dei quali presentano attività citotossica e genotossica. Allo scopo di studiare gli effetti protettivi esercitati da molecole antiossidanti su cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sottoposte a trattamento con CSC, sono stati effettuati esperimenti preliminari di valutazione della citotossicità del condensato utilizzando l'MTT test. La percentuale di vitalità cellulare, ottenuta valutando la funzionalità mitocondriale, è stata stimata dopo trattamento delle cellule con CSC a concentrazioni crescenti (0,1µg/ml-150µg/ml). I risultati ottenuti hanno mostrato una mortalità cellulare del 60% e del 95-98% nei trattamenti a concentrazioni di 50µg/mL e di 150µg/mL rispettivamente. In virtù di quanto osservato, si è indagato sulle possibili cause della morte cellulare e in particolare sulla capacità del CSC di indurre la produzione di radicali liberi. I radicali liberi sono stati rilevati attraverso tecniche di microscopia a fluorescenza, trattando le cellule con una sonda fluorescente, la 2'-7' diclorofluoresceina diacetato. Per indagare sulla possibilità di revertire il danno prodotto dal condensato, le cellule sono state trattate con la vitamina E, un noto agente scavenger. A tale scopo le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state esposte a CSC per 24 ore in presenza di vitamina E, alla concentrazione di 50microM. I risultati hanno evidenziato che la vitamina E è in grado di proteggere i neuroni dal danno indotto dal CSC.

P40. AUTOATTIVAZIONE DEL CYP3A4 E 2B6 EPATICI UMANI NEL METABOLISMO DEL PESTICIDA DIMETOATO

Buratti F.M.¹, Meneguz A.², Testai E.¹

¹*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ²*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La biotrasformazione degli xenobiotici catalizzata dal citocromo P450 di norma è descritta cinematicamente con l'equazione di Michaelis-Menten, da cui si ricavano i classici parametri cinetici V_{max} e K_m . È però noto che con alcuni substrati l'andamento della attività catalitica può essere descritto da un modello atipico di cinetica enzimatica. Uno di questi è l'autoattivazione (o cooperatività omotropica positiva), che avviene quando un substrato attiva il suo stesso metabolismo, dando origine a una curva di attività di tipo sigmoidale. In questo caso i parametri cinetici sono spesso stimati con l'equazione di Hill, il cui coefficiente n dà il grado di sigmoidicità e quindi di cooperatività o autoattivazione ($n > 1$; quando $n = 1$ si ha la classica curva di attività di Michaelis-Menten). Il fenomeno dipende dal substrato e dalla sua interazione con l'enzima: sono stati infatti riportati esempi di sostanze che danno autoattivazione solo con i CYP3A4 e 2B6 (diazepam e testosterone, rispettivamente), ma non con altri CYP. D'altro canto gli stessi 3A4 e 2B6 non sono autoattivati dalla maggior parte dei loro substrati. Spesso la sigmoidicità non è molto evidente; l'autoattivazione può essere evidenziata solo dalla linearizzazione della curva cinetica mediante Eadie-Hofstee, che mostra un andamento a "uncino". È stata studiata la bioattivazione del dimetoato, pesticida organofosforotionato (OPT), largamente utilizzato in agricoltura con singoli CYP umani ricombinanti, è stata confermata la maggiore efficienza del CYP1A2 nella formazione dell'oxon ($CL_i = 1,4 \pm 0,07$ nmoli oxon $(nmolCYP \cdot (min \cdot \mu M)^{-1})$), già evidenziata per altri OPT. Il ruolo dei CYP alla bioattivazione del dimetoato determinato con gli enzimi ricombinanti ($1A2 > 3A4 > 2B6$ e $3A4 > 1A2 > 2B6$ alle basse e alte concentrazioni, rispettivamente) è stato confermato anche in microsomi di fegato umano (HLM) fenotipizzati per le attività enzimatiche CYP-dipendenti. Quando è stato sottratto l'apporto del CYP1A2 alla bioattivazione del dimetoato, sono state evidenziate cinetiche atipiche, con la classica forma a uncino ($n = 1,6$ e $2,5$), imputabili a fenomeni di autoattivazione dei CYP 3A4 e 2B6. Risultati analoghi sono stati osservati sia con alcuni HLM, caratterizzati da attività particolarmente elevate correlate ai CYP 3A4 e 2B6, che con i CYP ricombinanti utilizzando il malathion come substrato. La autoattivazione dei CYP3A4 e 2B6 *in vivo* potrebbe influire sul contributo percentuale dei due isoenzimi alla formazione di metabolita tossico alle concentrazioni più elevate di pesticida, dando luogo a effetti tossici esagerati e inattesi in casi di intossicazione acuta.

Il lavoro è stato parzialmente finanziato dal progetto ISS Fasc.3AAS.

P41. PHYTOCHEMICALS E STRATEGIE CHEMIOPREVENTIVE: EFFETTI DELLA PESCA ED ESTRATTI FENOLICI SUGLI ENZIMI DEL *DRUG* *METABOLISM* NEL MODELLO ANIMALE

Canistro D.¹, Pozzetti L.¹, Broccoli M.¹, Affatato A.A.¹, Stradiotti A.¹, Sapone A.¹, Andreotti C.², Costa G.², Biagi G.L.¹, Paolini M.¹

¹Dipartimento di Farmacologia, Alma-Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna;

²Dipartimento di Colture Arboree, Alma-Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Studi epidemiologici suggeriscono che una dieta ricca di frutta e verdura, per la presenza di innumerevoli molecole naturali (*phytochemicals*), sia in grado di prevenire danni di tipo ossidativo quali tumori, disfunzioni cardio-circolatorie, reumatismi e malattie neurodegenerative. I *phytochemicals* avrebbero pertanto un ruolo fondamentale nel ridurre il rischio di cancro, soprattutto per azione a livello dei meccanismi di difesa primaria della cellula. Una delle strategie chemiopreventive più evocata prevede un incremento della *clearance* di carcinogeni chimici ubiquitari, mediante induzione selettiva degli enzimi detossificanti (fase II del metabolismo) e/o inibizione di quelli bioattivanti (fase I), principalmente a livello epatico, da parte di specifici xenobiotici. Tra le sostanze più studiate in questo contesto vi sono sicuramente i composti fenolici. Al fine di studiare l'attività chemiopreventiva complessiva della pesca (cultivar Stark Red Gold), in relazione al contenuto in composti fenolici, ratti maschi del ceppo Sprague Dawley sono stati trattati *per os*, sia con liofilizzato di pesca *in toto* (250 e 500 mg/kg p.c., 2 volte/die per 7 e 14 gg consecutivi), sia con estratto di pesca (2,5 e 5 ml/kg p.c., 2 volte/die per 7 e 14 gg). La caratterizzazione qualitativa e quantitativa del profilo fenolico dell'estratto di pesca è stata ottenuta mediante analisi HPLC in fase inversa, ed ha riguardato entrambe i tessuti eduli (epicarpo e mesocarpo) di frutti giunti alla maturazione di consumo. L'indagine analitica sul profilo fenolico dei frutti considerati segnala la presenza di circa 10 composti principali appartenenti alle classi degli acidi cinnamici, flavanoli, flavonoli e cianidine. Le concentrazioni medie del complesso dei composti fenolici estratti si attestano su valori di 3 mg/g p.s. nella polpa e 7 mg/g p.s. nella buccia. Su frazioni microsomiali epatiche è stata studiata la modulazione del sistema monoossigenasico citocromo P450 dipendente (CYP) e di enzimi di fase II. I risultati ottenuti in seguito a trattamento sia con pesche *in toto* sia con estratto indicano un marcato effetto inattivante su diverse isoforme CYP. Per la componente post-ossidativa, i risultati mostrano un modesto effetto induttivo a carico della UDP-glucuronosil transferasi; al contrario, per la glutatione S-transferasi è stato registrato un significativo calo. Tali risultati, oltre a fornire una caratterizzazione metabolica (*fingerprint*) indotta dalla pesca e dall'estratto fenolico, totalmente assenti nella letteratura scientifica, forniscono indicazioni circa il meccanismo dell'attività protettiva di questo frutto. I risultati comparabili ottenuti tra le due matrici suggeriscono il predominante ruolo dei *phytochemicals* di natura fenolica nel determinare l'effetto biologico complessivo del frutto.

P42. POTENZIALE AZIONE PROTETTIVA E ANTIOSSIDANTE DELLE MELE NEI CONFRONTI DEL DANNO GENETICO INDOTTO DAL PEROSSIDO DI IDROGENO IN LINFOCITI UMANI

Carbone F.¹, Maffei F.¹, Tarozzi A.¹, Hrelia S.², Marchesi A.¹, Cantelli Forti G.¹, Hrelia P.¹
¹Dipartimento di Farmacologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna;
²Dipartimento di Biochimica G. Moruzzi, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Nell'ultimo decennio gli studi epidemiologici hanno dimostrato come le abitudini alimentari possono influenzare l'incidenza di neoplasie, malattie neurodegenerative e cardiovascolari. Numerosi dati scientifici hanno evidenziato che la frutta e la verdura contengono micronutrienti (vitamine, polifenoli) ad attività antiossidante, capaci di ridurre il danno ossidativo al DNA causato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Poiché le mele costituiscono una delle principali fonti di polifenoli della dieta, è stato condotto uno studio per indagare la potenziale azione protettiva associata al consumo di mele nei confronti del danno genetico indotto dal perossido di idrogeno (H₂O₂) in linfociti umani di sangue periferico. Sono stati selezionati sei volontari sani maschi, non fumatori (età: 29,7±4,5; indice di massa corporea 23,5±2,0 kg/m²) che sono stati sottoposti a una dieta povera di sostanze ad attività antiossidante per 48 ore. Alla fine della dieta, sono stati somministrati 800 ml di omogeneizzato di mele non sbucciate, oppure una soluzione placebo (500 ml d'acqua). Dopo 0, 3 e 6 ore dall'assunzione dell'omogeneizzato di mele o del placebo è stato effettuato un prelievo di sangue periferico da ogni soggetto. I campioni ematici raccolti sono stati impiegati per valutare: 1) l'attività antiossidante totale nel plasma (TAA); 2) la formazione intracellulare di ROS in linfociti trattati con H₂O₂; 3) il danno genetico in termini di micronuclei (MN) in linfociti trattati *in vitro* con plasma e H₂O₂. I risultati preliminari hanno evidenziato una marcata riduzione della frequenza di MN indotti dall'H₂O₂ nei linfociti dei soggetti dopo la somministrazione dell'omogeneizzato di mela, rispetto alla soluzione placebo. In particolare, è stata riscontrata una riduzione del danno cromosomico H₂O₂-indotto di circa il 50 e il 40% nei campioni ottenuti rispettivamente a 3 e 6 h dall'assunzione delle mele. L'analisi dell'influenza del TAA del plasma sulla frequenza del danno genetico osservato ha indicato un'associazione significativa (r=0,961, P=0,039) tra la frequenza dei micronuclei e l'attività antiossidante. Risultati simili sono stati riscontrati riguardo l'influenza dell'incremento della formazione intracellulare di ROS e le frequenze del danno citogenetico (r=0,954, P=0,045). L'insieme dei dati ottenuti indicano che l'assunzione alimentare di mele concorre a contrastare il danno cromosomico indotto agenti ossidanti. Quest'approccio integrato di test *in vitro* ed *ex-vivo* potrebbe essere utile per comprendere i meccanismi che sottendono l'effetto protettivo dei micronutrienti presenti nella frutta e la verdura nei confronti del danno genetico associato all'esposizione a xenobiotici.

P43. EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE PERINATALE A METILMERCURIO E PCB153 SUI RECETTORI CEREBRALI DOPAMINERGICI E COLINERGICI IN RATTI IN ETÀ PUBERALE

Castoldi A.F.¹, Coccini T.¹, Roda E.², Marastoni L.², Manzo L.^{1,2}

¹*Servizio di Tossicologia, IRCCS, Fondazione Maugeri, Pavia;* ²*Università degli Studi di Pavia*

La suscettibilità del sistema nervoso in via di sviluppo al metilmercurio (MeHg) e ai PCB orto-sostituiti è documentata sia da dati epidemiologici che da studi sperimentali. Nei mammiferi i sistemi colinergico e dopaminergico sono implicati in diversi processi dello sviluppo cerebrale e rappresentano potenziali bersagli di tossicità dei suddetti contaminanti alimentari. In questo studio gli effetti dell'esposizione materna a MeHg (0,5 mg/kg/die nell'acqua da bere) e/o PCB153 (5 mg/kg/die nella dieta) durante la gravidanza e l'allattamento (GD7-PND21) sono stati valutati sulla densità (Bmax) dei recettori D2-like dopaminergici (D2-R) e dei recettori colinergici muscarinici (MR) nella prole di ratto in corrispondenza del 36° giorno postnatale. Il numero totale di recettori D2-R e MR è stato determinato mediante esperimenti di saturazione di binding recettoriale utilizzando quali rispettivi ligandi marcati il ³H-YM-09151-2 e il ³H-QNB. Nello striato un dato comune a maschi e femmine era rappresentato (Bmax di controllo=200±54 e 189±42 fmol/mg proteine) dalla lieve riduzione (pari a circa il 10%), indotta dal MeHg, della densità dei D2-R, in assenza di alcun effetto del PCB153, sia da solo che in combinazione. Nella corteccia cerebrale di entrambi i sessi (Bmax di controllo=48-57 fmol/mg proteine), il PCB153 aumentava il numero di D2-R (50%), il MeHg era inefficace e la co-esposizione mimava l'effetto del PCB. Relativamente agli MR nello striato, le femmine ma non i maschi mostravano una riduzione del 20% della Bmax (controlli 1250±350 e 1360±380 fmol/mg protein) dopo esposizione a MeHg. L'opposta suscettibilità sesso-correlata si osservava dopo esposizione a PCB153. Il numero di MR nella corteccia cerebrale di tutti i rattini era ridotto di circa il 10-20% sia dal MeHg che dal PCB153, somministrati sia da soli che in combinazione. In conclusione, il MeHg e il PCB153, somministrati singolarmente e a dosi moderate per tutta la durata della gravidanza e dell'allattamento, alterano lievemente la densità dei recettori D2-R e MR nel cervello di ratti in età puberale. La suscettibilità dei recettori D2-R e MR al MeHg e/o al PCB153 varia in funzione dell'area cerebrale considerata ed è sesso-correlata. Degna di particolare nota è la completa assenza di effetti additivi o sinergici relativamente agli end-point considerati in seguito a esposizione combinata.

Grants della Commissione Europea: QLK4-CT-2001-00186; FOOD-CT-2003-506543; del Ministero della Salute e del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca.

P44. I RECETTORI MUSCARINICI LINFOCITARI QUALI INDICATORI DI EFFETTI CEREBRALI DELL'ESPOSIZIONE PERINATALE A METILMERCURIO NEL RATTO

Coccini T.¹, Acito S.¹, Randine G.¹, Castoldi A.F.¹, Manzo L.^{1,2}

¹*Servizio di Tossicologia, IRCCS, Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia;* ²*Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Università degli Studi di Pavia*

L'inquinamento ambientale e alimentare da metilmercurio (MeHg) inizialmente ritenuto un problema acuto e a carattere locale, è ormai riconosciuto come un problema diffuso e cronico a livello mondiale. L'assunzione di dosi relativamente ridotte possono avere gravi effetti negativi sullo sviluppo neurologico anche prima della nascita. Studi *in vitro* e *in vivo* suggeriscono che il sistema colinergico muscarinico sia uno dei bersagli di tossicità del MeHg e il recettore muscarinico (RM) uno specifico end-point. Tale recettore, a livello linfocitario, viene considerato un potenziale indicatore periferico dello stesso parametro presente a livello cerebrale. Con lo scopo di valutare se i RM linfocitari riflettano cambiamenti centrali, sono stati valutati nel ratto gli effetti della somministrazione perinatale (GD7-PND7) del MeHg, alle dosi di 0,5 e 1mg/kg/die nell'acqua da bere, sulla densità (Bmax) dei RM in alcune aree cerebrali e nei linfociti splenici delle madri e della prole a 21 giorni dopo il parto. Sono stati altresì misurati i livelli di Hg totale nel cervello e sangue mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico con vapori freddi. L'esposizione a 1mg MeHg/kg/die determinava un aumento significativo della densità dei RM nella corteccia cerebrale delle madri (60%) e della prole sia maschile (27%) che femminile (50%) (i valori delle Bmax di controllo erano: 583±13, 503±31, 545±10 fmol/mg protein). Anche nel cervelletto il MeHg aumentava la densità recettoriale sia negli adulti (87%; Bmax di controllo: 83±17 fmol/mg prot) sia negli immaturi (27%; Bmax di controllo: 119-127 fmol/mg protein). I livelli cerebrali di Hg (microg/g) erano pari a 7-9 nelle madri, 1,67±0,43 nella prole maschile e 1,52±0,33 nella prole femminile. Nel sangue i valori di Hg (microg/l) erano 11330±2258 nelle madri, 1351±395 nella prole maschile e 1313±397 in quella femminile. Similmente a quanto osservato nel cervello, il MeHg aumentava il numero dei RM nei linfociti (Bmax di controllo: 30-60 fmol/million cells) più marcatamente nell'adulto (139%) che nell'immaturo (45-73%). La densità dei RM cerebrali e linfocitari non veniva modificata alla dose di 0,5mg MeHg/kg/die. In conclusione, i RM sono dei bersagli di tossicità dell'esposizione perinatale a MeHg nei linfociti così come nel cervello. Gli RM risultano aumentati in entrambi i distretti maggiormente nell'adulto che nella prole in accordo con i livelli più elevati di Hg nel tessuto maturo. Questo endpoint periferico sembra un promettente indicatore degli effetti indotti da MeHg sul sistema colinergico centrale nel ratto.

Contributi da: Commissione Europea ANEMONE, QLK4-CT-2001-00186 e DEVNERTOX, FOOD-CT-2003-506543; Ministero della Salute; MIUR).

P45. EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE PERINATALE A METILMERCURIO E PCB153 SU ALCUNI PARAMETRI DELLA NEUROTRASMISSIONE DOPAMINERGICA E SEROTONINERGICA NEL CERVELLO DI RATTO

Coccini T.¹, Blandini F.², Acito S.¹, Roda E.¹, Marastoni L.¹, Manzo L.^{1,3}, Castoldi A.F.¹

¹*Servizio di Tossicologia, IRCCS, Fondazione Maugeri, Pavia;* ²*Laboratorio di Neurochimica Funzionale, IRCCS, Istituto Neurologico Mondino, Pavia;* ³*Università degli Studi di Pavia*

Il metilmercurio (MeHg) e i bifenili policlorurati (PCB) sono contaminanti alimentari ampiamente diffusi con documentata azione neurotossica durante lo sviluppo. Alcuni sistemi della neurotrasmissione centrale, inclusi quello dopaminergico e serotoninergico, rappresentano un possibile target comune di questi contaminanti. Scopo del presente studio è stato quello di indagare, nel cervello di ratti di 21 giorni di età, gli effetti dell'esposizione materna singola e combinata a MeHg (1 mg/kg/die, GD7-PND7, nell'acqua da bere) e PCB153 (20 mg/kg/die, GD10-GD16 *per os*) (i) sull'attività della monoamminoossidasi di tipo B (MAO-B; determinata con metodo radiochimico) e (ii) sui livelli di dopamina (DA), serotonina (5-HT), acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA) e acido omovanillico (HVA) misurati mediante HPLC. (i) *Attività cerebrale della MAO-B.* Nella prole di sesso maschile, il cervelletto, a differenza delle altre aree cerebrali (corteccia cerebrale, ippocampo e striato), presentava una riduzione significativa dell'attività enzimatica (25-45%) in seguito a tutti i tipi di trattamento. Per contro, nella prole di sesso femminile l'attività della MAO-B non risultava alterata da alcun trattamento in alcuna regione cerebrale. (ii) *Livelli cerebrali di DA, HVA, 5-HT e 5-HIAA.* Nella corteccia cerebrale un effetto comune sia ai maschi che alle femmine era il significativo decremento dei livelli di 5HT (30-50%) (controlli: 2,4-4,2ng/mg proteine) indotto dal PCB153 da solo e in combinazione con il MeHg, in assenza di variazioni nei livelli di 5HIAA. Non si evidenziavano, invece, alterazioni a carico del sistema dopaminergico. Nel cervelletto, l'unica variazione significativa riscontrata nella prole di entrambi i sessi consisteva nell'innalzamento dei livelli di 5-HIAA indotto dal MeHg. Tale incremento era mascherato nel caso di co-esposizione a PCB153, che peraltro da solo era privo di effetto. Nell'ippocampo di maschi e femmine, il MeHg e il PCB153, somministrati singolarmente, riducevano la concentrazione del metabolita della dopamina HVA rispettivamente del 40 e del 60%, in assenza di effetti sinergici in seguito a esposizione combinata. Nello striato, il PCB153 causava una riduzione del contenuto di DA, HVA e 5-HIAA (rispettivi valori di controllo: 2-3; 60-80; 8-10ng/mg proteine) di simile entità quando somministrato da solo e in miscela (20-40%). In conclusione, i risultati dimostrano che l'esposizione a MeHg e/o PCB153 durante lo sviluppo modifica i sistemi cerebrali dopaminergico e serotoninergico in modo differente a seconda del sesso e dell'area cerebrale considerata. L'esposizione combinata a MeHg e PCB153 non esacerba, ma talvolta addirittura attenua le alterazioni neurochimiche indotte dai composti somministrati singolarmente.

Grants EU: QLK4-CT-2001-00186; FOOD-CT-2003-506543; Ministero della Salute e MIUR.

P46. EFFETTI NEUROCOMPORTAMENTALI PRODOTTI DALL'ESPOSIZIONE PRENATALE AL METILMERCURIO NELLA PROGENIE DI RATTO

Coluccia A.¹, Borracci P.¹, Giustino A.¹, Renna G., Carratù M.R.¹, Cuomo V.²

¹Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Bari; ²Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia V. Ersparmer, Università degli Studi La Sapienza, Roma

Il metilmercurio (MeHg) è un inquinante ambientale particolarmente tossico per il sistema nervoso in via di sviluppo. L'esposizione in gravidanza, anche a dosi non teratogene, può pertanto indurre rilevanti deficit neurofunzionali nella prole. Scopo del presente studio è stato quello di analizzare, nella progenie maschile di ratto, gli effetti neurocomportamentali indotti dall'esposizione prenatale a una singola dose di MeHg (8 mg/kg) all'8° e al 15° giorno di gestazione (GG). A tale scopo, ratte gravide Sprague-Dawley sono state assegnate a tre gruppi di trattamento: 1) controllo; 2) MeHg 8 mg/kg, GG8; 3) MeHg 8 mg/kg, GG15. Le funzioni motorie (*open field test*) e la *working memory* (*novel exploration object test*) sono state studiate nella progenie a 40 giorni di vita, mentre i processi di apprendimento e memoria sono stati analizzati nella progenie di 90 giorni di età sottoposta ai test di *passive* e *active avoidance*. Sono stati, inoltre, valutati i parametri della riproduzione e dello sviluppo. L'esposizione materna a MeHg è risultata essere associata a una elevata mortalità post-natale (GG8: $p < 0,02$; GG15: $p < 0,0001$, Fisher's-exact test) e a una significativa riduzione ponderale della progenie al 21° giorno di vita (GG15: $p < 0,01$, Tukey's test). I risultati ottenuti con il test dell'*open field* dimostrano che il trattamento prenatale con MeHg riduce significativamente il numero dei rearings (GG8: $p < 0,01$; GG15: $p < 0,05$, Tukey's test), indice di un'alterata attività esplorativa dell'animale, lasciando invariati il numero di crossings e il tempo di inattività. Nei ratti esposti a MeHg (8 mg/kg al GG8) e sottoposti al *novel exploration object test* si osservano: (i) una significativa riduzione dell'attività esplorativa durante T1 ($p < 0,05$, Dunn's test); (ii) un'alterazione dell'indice globale di *habituation* ($p < 0,05$, Dunn's test) e (iii) un'incapacità di discriminazione tra oggetto nuovo e oggetto familiare, indice di un'alterata memoria di lavoro. Il trattamento prenatale con MeHg non modifica la latenza di approccio nel trial di acquisizione di un programma di evitamento passivo; tuttavia, quando il test viene ripetuto a distanza di 24 ore, si osserva una riduzione della latenza di evitamento nel gruppo trattato al GG8 ($p < 0,01$, Dunn's test). Infine, l'esposizione prenatale a MeHg altera significativamente l'apprendimento di un programma di condizionamento di evitamento attivo (GG8: *third block* = $p < 0,05$; *fourth block* = $p < 0,001$; GG15: *fourth block* = $p < 0,05$, Tukey's test). In conclusione, i risultati sottolineano l'elevato rischio di deficit cognitivi a breve e lungo termine nella progenie di madri esposte a una dose singola e subteratogena di MeHg in gravidanza.

P47. SALUTE RIPRODUTTIVA E LAVORO FEMMINILE

Desogus G.F., Murru C.

Servizio Prevenzione e Protezione, Direzione Sanitaria Medica, Azienda USL 7, Carbonia

Lo studio in esame valuta gli effetti sulla funzione riproduttiva femminile associati a eventi stressanti lavorativi in personale sanitario. Il campione è costituito da personale medico e infermieristico ospedaliero (78 casi) esposto ad alti stimoli stressanti durante lo svolgimento delle attività lavorative di competenza. La valutazione dei livelli di stress psico-fisico è effettuata con l'analisi dei dati raccolti a seguito di somministrazione di questionari autocompilati con la garanzia dell'anonimato, considerando specifici fattori legati all'organizzazione del lavoro, agli orari protratti, ai turni di lavoro, al livello di attività fisiche, alle esposizioni specifiche, all'ambiguità dei ruoli, al carico di lavoro e ai livelli di soddisfazione personale. La selezione è basata sulla garanzia dell'uniformità dei soggetti in esame come campione rappresentativo dell'area emergenza e rianimazione ospedaliera prendendo in considerazione parametri di confronto specifici (età, anzianità lavorativa, abitudini voluttuarie, distribuzione di carichi di lavoro e condizione lavorativa). L'analisi dei risultati dimostra un'associazione significativa tra effetti negativi sulla funzione riproduttiva (ritardo del tempo di concepimento, aborti spontanei, alterazioni del ciclo mestruale, minacce d'aborto) e popolazione in esame esposta ad alto rischio di stress psico-fisico, con un potenziale rischio di sviluppare patologie riproduttive maggiore nel personale infermieristico (HI=0,76) rispetto a quello medico (HI=0,45). Tali effetti sono correlabili con alcuni disturbi soggettivi percepiti di tipo psicosomatico nella popolazione in esame (disturbi del sonno, ansia, irritabilità, cefalee, depressione, insonnia, impossibilità di ricordare i sogni, uso di farmaci prima di dormire, stanchezza eccessiva, crisi di sonnolenza durante il lavoro) che risultano maggiori nel personale infermieristico. Lo studio ha evidenziato una condizione di disagio psico-fisico nelle professioni sanitarie ad alto carico di lavoro che rappresenta un potenziale rischio per la salute riproduttiva femminile e rende necessaria una progettazione di interventi preventivi per garantire una condizione di benessere fisico, psichico e sociale nel personale esposto.

P48. ALTERAZIONI DEL CICLO MESTRUALE IN ESPOSTE A STRESS PSICO-FISICO IN AMBITO SANITARIO

Desogus G.F., Caracoi S.

Servizio Prevenzione e Protezione e Medico Competente, Azienda USL 7, Carbonia

Sono noti effetti derivati da stress psico-fisico sulla funzione gonadica a livello endocrino con alterazioni degli ormoni femminili ed effetti adversi a livello di oogenesi e fertilità femminile. Scopo del lavoro è quello di valutare alterazioni sulla salute riproduttiva e sulla regolarità del ciclo mestruale correlabili con una condizione lavorativa stressante. Lo studio preliminare è stato effettuato su personale sanitario femminile costituito da 25 medici e 53 infermiere dell'area emergenza, pronto soccorso e rianimazione ospedaliera, operatori selezionati sulla base della tipologia lavorativa, del carico di lavoro, dei turni e degli orari protratti. I risultati evidenziano prevalenze significative nel caso di amenorrea (18,2% dei casi), dismenorrea (25,3% dei medici e 22,1% delle infermiere) e prolungamento del ciclo (18,2% dei medici e 19,1% delle infermiere). Il rapporto tra i tassi è sempre superiore alla norma e le differenze risultano statisticamente significative rispetto a una popolazione di controllo. L'esposizione a livelli di stress psico-fisico rappresenta un fattore di rischio per la salute riproduttiva femminile e l'obiettivo primario rimane la riduzione del tipo di esposizione attraverso una progressiva eliminazione delle diverse costrittività organizzative presenti nell'ambito lavorativo, con una redistribuzione e omogeneizzazione dei carichi di lavoro, eliminazione di orari protratti e garanzia di comfort ambientale.

P49. EFFETTI DELLA LONIDAMINA SUGLI ORMONI STEROIDEI NEL TESTICOLO DI TOPO DURANTE LO SVILUPPO PUBERALE

Guarino M., Natoli A., Romeo A., Urbani E., Traina M.E.
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'attività antispermatogonica della Lonidamina (LND), un farmaco antitumorale che interferisce con il metabolismo cellulare, è stata studiata in diversi modelli sperimentali. I danni indotti dalla LND sull'epitelio seminifero sono stati ampiamente descritti, mentre mancano quasi totalmente informazioni riguardanti l'omeostasi ormonale a livello testicolare. Il presente studio è stato pertanto indirizzato alla valutazione degli effetti indotti dalla LND sui livelli di alcuni ormoni steroidei nel testicolo di topo CD1, durante lo sviluppo puberale. Topi maschi di 28 giorni sono stati trattati per via orale con una singola dose di LND di 100mg/kg p.c. e sacrificati 24, 48, 72, 96 ore, 7 e 14 giorni dopo la somministrazione (6-8 topi per gruppo) per la valutazione dei seguenti parametri: peso testicolare assoluto e relativo, numero e concentrazione degli spermatozoi, esame istopatologico e livelli testicolari di testosterone, androstenedione, 17-OH-progesterone e 17-beta-estradiolo. Variazioni statisticamente significative di tutti i parametri testicolari sono state osservate nei primi giorni dopo il trattamento. In associazione alle alterazioni istologiche dell'epitelio seminifero, caratteristiche dell'azione della LND, evidenziabili già dopo 24 ore e fino a 7 giorni dopo il trattamento, è stato osservato un aumento significativo del peso testicolare nei primi 3 giorni (+45% del controllo a 48 ore) e una riduzione del numero di spermatozoi nei primi 4 giorni (fino al 65% del controllo). Due settimane dopo il trattamento questi parametri erano completamente recuperati. La LND induceva, 48 e 72 ore dopo la somministrazione, una riduzione statisticamente significativa del contenuto medio di testosterone e di androstenedione del 58-65% e 35-45% rispettivamente. Il livelli dei due ormoni erano quasi totalmente ristabiliti 96 ore dopo e tendevano a essere più elevati rispetto ai valori medi di controllo 7 giorni dopo il trattamento. Il 17-OH-progesterone, precursore metabolico dei due androgeni nella biosintesi steroidea a livello della cellula del Leydig, risultava invece significativamente aumentato rispetto ai controlli a 24 e 48 ore (>100%), mantenendosi ancora elevato fino a 14 giorni dopo il trattamento. Il 17-beta-estradiolo era ugualmente aumentato rispetto ai controlli 96 ore dopo il trattamento, mentre nessuna variazione significativa era evidenziata agli altri tempi di osservazione. Questi risultati mostrano, per la prima volta, una probabile suscettibilità della cellula del Leydig alla LND e suggeriscono che le alterazioni dell'equilibrio ormonale a livello testicolare indotte da questo farmaco possano essere in parte responsabili degli effetti osservati nell'epitelio seminifero.

P50. RUOLO DEL CA²⁺ NELLA FORMAZIONE MITOCONDRIALE DI SPECIE CHE GENERANO LESIONI A LIVELLO DEL DNA GENOMICO IN CELLULE ESPOSTE AL PEROSSINITRITO

Guidarelli A.¹, Clementi E.^{2,3,4}, Sciorati C.², Cantoni O.¹

¹*Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino;*

²*Istituto di Ricerca sulle Cellule Staminali, Dipartimento di Biotecnologie, Ospedale San*

Raffaele, Milano; ³*Integrated Laboratories Network, Department of Preclinical Sciences,*

Ospedale Luigi Sacco, Università degli Studi di Milano; ⁴*Istituto Scientifico Eugenio*

Medea, Bosisio Parini, Lecco

Il perossinitrito produce lesioni a livello del DNA genomico attraverso un meccanismo che prevede l'inibizione del complesso III e la successiva formazione di superossidi in una reazione in cui l'ubisemichinone funge da donatore di elettroni. L'H₂O₂, prodotto per dismutazione dei superossidi, genera in modo sito-specifico radicali ossidrilici che generano le interruzioni a singolo filamento del DNA (SSB) attraverso l'interazione con il ferro bivalente legato alla cromatina. Il presente studio dimostra che la formazione di superossidi/H₂O₂ è controllata dalla disponibilità di Ca²⁺ nel compartimento mitocondriale. Esperimenti condotti in cellule intatte o permeabilizzate indicano che la risposta genotossica mediata dal perossinitrito viene aumentata in modo significativo da trattamenti che evocano un aumento del contenuto di Ca²⁺ mitocondriale, mentre una marcata riduzione della formazione di SSB è stata osservata a seguito di manipolazioni che causavano l'inibizione della mobilizzazione di Ca²⁺, o che determinavano l'inibizione della clearance mitocondriale del catione. Ulteriori evidenze sperimentali hanno dimostrato che il perossinitrito mobilizza Ca²⁺ dai siti sensibili alla rianodina. Come conseguenza, la rianodina era in grado di inibire la mobilizzazione di Ca²⁺, l'aumento del contenuto mitocondriale del catione, la formazione mitocondriale di superossidi e l'induzione di SSB mediati dal perossinitrito. Questi risultati, insieme con precedenti risultati che indicavano che le SSB indotte dal perossinitrito erano anche soppresse dall'inibizione del trasporto degli elettroni attraverso il complesso I, e.g. dal rotenone, o dal fenotipo della respiratorio-deficienza, dimostrano che la formazione mitocondriale di specie genotossiche evocata dal perossinitrito è regolata in modo critico sia dall'inibizione del complesso III che dalla disponibilità mitocondriale di Ca²⁺.

P51. CORRELAZIONE TRA LIVELLI DI CORTICOSTERONE E PALATOSCHISI: EFFETTI TERATOGENI DI AF3173 NEL RATTO

Landolfi C., Campana A., Mangano G., Guglielmotti A.
Angelini Farmaceutici, ACRAF SpA, S. Palomba, Pomezia, Roma

Numerose evidenze suggeriscono che l'incremento dei livelli di steroidi durante l'organogenesi induce comparsa di malformazioni cranio-facciali. Il presente lavoro ha lo scopo di verificare la possibile correlazione tra innalzamento dei livelli di corticosterone endogeno e attività teratogena e fornire un approccio preliminare di breve termine *in vivo* sufficientemente predittivo del potenziale rischio di nuove molecole. AF3173 è stato somministrato per via orale (50-400 mg/kg) in ratti Sprague Dawley maschi adulti e 1h dopo il trattamento i livelli serici di corticosterone sono stati misurati mediante metodo immunoenzimatico. I risultati hanno mostrato un aumento dose-dipendente dei livelli di corticosterone con un effetto significativo a partire da 200 mg/kg e un incremento a 400 mg/kg che risulta circa 26 volte quello basale. Di conseguenza successivi esperimenti sono stati condotti per verificare il potenziale teratogeno di AF3173. Il prodotto è stato somministrato per via orale alle dosi di 64, 160 e 400 mg/kg in ratti Sprague Dawley femmine nei giorni 6-15 di gravidanza seguendo un protocollo standard (OECD 414). In queste condizioni sperimentali il trattamento con AF3173 ha indotto in maniera dose-dipendente malformazioni cranio-facciali. Alla dose di 160 mg/kg è stata osservata presenza di palatoschisi nel 20% dei feti vitali e alla dose di 400 mg/kg i feti erano affetti da palatoschisi (100%) e agnazia (81%). Allo scopo di approfondire la relazione tra innalzamento dei livelli di corticosterone e malformazioni osservate, è stato condotto un secondo studio somministrando AF3173 alla dose di 400 mg/kg in ratte gravide nel periodo di organogenesi critico per la formazione delle strutture cranio-facciali (giorni 14 e 15 di gestazione). L'utilizzo di questo protocollo a "breve termine" ha dimostrato un'incidenza di malformazioni nel 66% dei feti con palatoschisi (38%) e agnazia/microagnazia (57%). I dati ottenuti suggeriscono che l'aumento di corticosterone indotto dal trattamento con AF3173 è responsabile delle malformazioni cranio-facciali osservate e rafforzano il potenziale rischio teratogeno di molecole che direttamente o indirettamente interferiscono con i livelli di steroidi.

P52. EFFETTI SUL CICLO CELLULARE E INDUZIONE DI APOPTOSI DELL'ISOTIOCIANATO SULFORAFANE SU COLTURE DI CELLULE T-LINFOLASTOIDI

Lenzi M., Fimognari C., Cantelli Forti G., Hrelia P.

Dipartimento di Farmacologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Gli isotiocianati sono composti di origine naturale dotati di comprovata capacità chemiopreventiva. Un isotiocianato particolarmente promettente è il Sulforafane, potente induttore degli enzimi di fase II del farmacometabolismo, che esercita effetti citostatici e citotossici su diverse linee tumorali. In questo studio abbiamo indagato la capacità del Sulforafane di modulare il ciclo cellulare e di indurre apoptosi su una linea cellulare T linfoblastoide (cellule Jurkat), valutando anche alcuni dei meccanismi molecolari coinvolti (p53, bax, bcl2). Le cellule Jurkat sono state coltivate in terreno RPMI 1640, supplementato al 10% con Siero Fetale Bovino (FCS), all'1% con Penicillina e Streptomicina e all'1% con Glutammina. Le cellule sono state trattate con differenti concentrazioni di Sulforafane (3-10-30 μ M). L'analisi citofluorimetrica degli effetti del Sulforafane sulla modulazione del ciclo cellulare, sull'induzione di apoptosi e sull'espressione delle proteine p53, bax e bcl-2 ha evidenziato che il Sulforafane blocca il ciclo cellulare in fase G2/M e incrementa la frazione di cellule apoptotiche. Entrambi gli effetti appaiono essere dose- e tempo-dipendenti. In particolare, una prolungata esposizione delle cellule Jurkat al Sulforafane provoca una diminuzione delle cellule in fase G1 e S e in proporzione un marcato aumento delle cellule in fase G2/M. Inoltre, dopo 8 ore di trattamento con Sulforafane 30 μ M, si nota un 5% di cellule apoptotiche (Annexina V^{pos}- Propidio Ioduro^{neg}), percentuale che aumenta al 16% dopo 24 ore e al 32% dopo 48 ore. La frazione di cellule necrotiche (Annexina V^{pos}- Propidio ioduro^{pos}) presenta la stessa cinetica. Si nota infatti solo un 3% di cellule necrotiche dopo 8 ore di trattamento e questa frazione aumenta dal 14% al 30% dopo 24 e 48 ore, rispettivamente. Per esaminare gli effetti del Sulforafane sui livelli di p53, bax e bcl2, le cellule sono state trattate per 48 ore con Sulforafane 30 μ M, evidenziando un marcato aumento nell'espressione di p53 e di bax rispetto al controllo, mentre i livelli di bcl2 sono rimasti quasi invariati. In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano che il Sulforafane possiede interessanti proprietà biologiche, che giustificano ulteriori ricerche tese alla valutazione del potenziale chemiopreventivo e delle proprietà farmacologiche dell'isotiocianato.

P53. ALTI LIVELLI DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA) NEL FUMO DIRETTO DI SIGARETTE CINESI

Lodovici M.¹, Akpan V.¹, Huang S.², Dolara P.¹

¹*Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi di Firenze;*

²*Guangxi Center for Disease Prevention and Control, 70 Tao Yuan Road, Nanning, Guangxi*

Entro il primo luglio del 2004, i livelli di “tar” e nicotina nelle sigarette cinesi dovevano essere in linea con i valori stabiliti dalla normativa dell’EU. Nessun dato era presente in letteratura su i livelli di composti cancerogeni, come gli IPA, nelle sigarette cinesi e comunque tre mesi prima di quella data dalle nostre analisi risultava che i livelli di tar e nicotina in diverse marche cinesi erano superiori ai livelli dichiarati. Lo scopo di questo studio è stato quindi la determinazione dei livelli di “tar”, nicotina, CO e IPA, in 20 marche di sigarette cinesi acquistate in Cina nel periodo 2003-2004. Dalle nostre analisi è risultato che tra le 20 marche testate solo 4 avevano livelli di “tar” e nicotina in linea con i valori dichiarati e con quelli stabiliti dalla EU. I livelli degli IPA cancerogeni erano circa 1,5 volte più alti di quelli misurati nelle sigarette italiane, ma analizzati singolarmente, il benzo(a)pirene e il dibenzo(a,h)pirene, IPA con maggior attività cancerogena, avevano livelli da 2 a 7 e da 2 a 9 rispettivamente, più alti in confronto a quelli misurati nelle sigarette italiane. Una buona correlazione è stata comunque trovata fra i livelli di “tar” e IPA cancerogeni nelle sigarette cinesi ($r=0,535$, $P<0,01$). Da i nostri dati risulta quindi che la determinazione di parametri facili da misurare, quali “tar” e nicotina nel fumo diretto, potrebbe essere usata come sistema di controllo di qualità delle diverse marche di sigarette che provengono dai paesi in via di sviluppo.

P54. EFFETTI A LUNGO TERMINE DELLA NICOTINA SUL FORCED SWIMMING TEST: UN MODELLO SPERIMENTALE PER LO STUDIO DEI DISTURBI DELL'UMORE CAUSATI DAL FUMO

Mannucci C., Tedesco M., Caputi A.P., Calapai G.

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale e di Farmacologia, Sezione di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Messina

Sono numerose le evidenze scientifiche che mettono in relazione il fumo di sigaretta e i disturbi dell'umore. È stato ipotizzato che nei fumatori si possa sviluppare una maggiore sensibilità a diverse forme di stress ed è stato anche dimostrato che la nicotina, principale responsabile della dipendenza, interagisce oltre che con numerosi sistemi neurotrasmettitoriali, anche con il sistema serotoninergico, coinvolto nei disturbi dell'umore. In particolare è stato osservato che la nicotina aumenta il rilascio di serotonina dai sinaptosomi striatali *in vitro* e ne stimola *in vivo* il rilascio nella corteccia frontale di ratto. Allo scopo di studiare i collegamenti tra fumo e depressione abbiamo indotto la dipendenza da nicotina in topi maschi Swiss somministrando una dose di 2 mg/kg x 4 somministrazioni sottocutanee al giorno x 14 giorni. Un gruppo di animali trattati con soluzione fisiologica è servito da gruppo di controllo. Alla fine del periodo di somministrazione è stato valutato il grado di astinenza mediante una scala di punteggi (Total Abstinence Scale). Gli animali resi dipendenti sono stati sottoposti al forced swimming test a 24 ore, 7, 15 e 30 giorni dall'ultima somministrazione di nicotina. In questo test gli animali posti per 6 minuti in un contenitore cilindrico contenente acqua, adottano un atteggiamento caratterizzato da immobilità per gran parte del test. Gli animali in cui è stata indotta la dipendenza hanno mostrato una riduzione della mobilità, a tutti i tempi di osservazione. La alterazione della mobilità è abolita dal pre-trattamento con l'aminoacido 5-idrossitriptofano (precursore della serotonina). È stato inoltre misurato il contenuto diencefalico di serotonina alla fine del periodo di somministrazione della nicotina, e a 15, 30 e 60 giorni dall'ultima somministrazione di nicotina. Negli animali resi dipendenti, si è osservato, alla fine del periodo di somministrazione di nicotina, un aumento dei livelli diencefalici di serotonina. Questo aumento si è ridotto gradualmente a 15, 30 e 60 giorni dopo l'astinenza. È stata anche valutata l'espressione del recettore 5-HT_{1A} mediante western blotting. I risultati ottenuti, mostrano una riduzione significativa dell'espressione del recettore negli animali resi dipendenti. Questa riduzione è presente alla fine del periodo di somministrazione e ancora evidente a 60 giorni di astinenza da nicotina. I nostri risultati dimostrano che alterazioni comportamentali valutate col forced swimming test, sono presenti negli animali resi dipendenti da nicotina, sia alla fine del periodo di somministrazione, che settimane dopo l'ultima somministrazione. Inoltre i cambiamenti nel contenuto diencefalico di serotonina e del recettore 5-HT_{1A}, suggeriscono che la serotonina può avere un ruolo nei disordini dell'umore successivi all'astinenza da nicotina.

P55. EFFETTI DELLA CIANIDINA-3-O-BETA-GLUCOPIRANOSIDE SUL DANNO CELLULARE INDOTTO DAI RAGGI UVA IN CHERATINOCITI IN COLTURA

Marchesi A., Tarozzi A., Cantelli Forti G., Hrelia P.

Dipartimento di Farmacologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Le radiazioni ultraviolette (UV) rappresentano uno dei più importanti fattori ambientali causa di rischio per la salute umana. Negli ultimi anni la ricerca è stata rivolta non tanto verso gli ormai assodati effetti cancerogeni delle radiazioni UVB (290-320 nm), quanto ai possibili rischi determinati dalle radiazioni UVA (320-400 nm). A livello cellulare, l'esposizione alla radiazione UVA è responsabile di una formazione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS), in grado di provocare un danno cellulare esteso ed eventualmente morte cellulare tramite necrosi e/o apoptosi. Recenti studi hanno evidenziato l'azione fotocitoprotettiva che alcune sostanze di origine naturale sono in grado di svolgere a livello cutaneo. Il presente studio si è posto l'obiettivo di valutare l'attività fotocitoprotettiva della cianidina-3-O-beta-glucopiranoside (C-3-G), un'antocianina presente in molti frutti e vegetali, nei confronti dell'apoptosi indotta dai raggi UVA in una linea cellulare di cheratinociti umani (HaCaT) rappresentativa dell'epidermide. Il trattamento delle cellule HaCaT con C-3-G prima dell'irraggiamento con UVA è in grado di inibire meccanismi cellulari che sottendono l'apoptosi, quali la frammentazione del DNA (54%) e l'attivazione della caspasi 3 (33%). Successivamente è stata valutata la capacità della cianidina di contrastare la formazione di ROS nelle cellule HaCaT irraggiate con UVA: la C-3-G si è dimostrata in grado di inibire il rilascio di H₂O₂ (41%), un indicatore della formazione intracellulare di ROS. Un'ulteriore dimostrazione dell'abilità della C-3-G di contrastare la formazione di ROS si è ottenuta dimostrando la sua capacità di accrescere la resistenza delle cellule HaCaT agli effetti apoptotici dell'anione superossido e di H₂O₂, due ROS coinvolti nello stress ossidativo indotto da UVA. Inoltre, il trattamento con C-3-G porta a un maggior incremento di attività antiossidante nella frazione isolata della membrana cellulare (55%) rispetto alla frazione citoplasmatica (19%). Tale risultato evidenzia come la C-3-G abbia la capacità di concentrarsi nella membrana cellulare in quantità superiore rispetto al citoplasma. Si può quindi ipotizzare che la C-3-G eserciti la sua azione fotocitoprotettiva nei confronti dei raggi UVA grazie alla sua azione *scavenger* a livello della membrana cellulare. Tali risultati preliminari pongono le basi giustificative di una successiva ricerca mirata a identificare la C-3-G (e altre antocianine) come un nuovo agente per la fotoprotezione della cute.

P56. EFFETTI ANTIAPOPTOTICI E ANTIOSSIDANTI DELLA CIANIDINA-3-O-BETA-GLUCOPIRANOSIDE E DEL SUO AGLICONE IN UNA LINEA NEURONALE UMANA

Morroni F., Tarozzi A., Cantelli Forti G., Hrelia P.

Dipartimento di Farmacologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Le malattie di Parkinson e di Alzheimer sono patologie caratterizzate da una progressiva degenerazione neurologica, il cui rischio aumenta con l'invecchiamento. Numerose evidenze scientifiche supportano l'ipotesi che il danno ossidativo e i difetti nella funzionalità mitocondriale rappresentino eventi precoci nella patogenesi delle malattie neurodegenerative. Recenti studi dimostrano come antiossidanti di origine naturale sono in grado di bloccare la morte neuronale *in vitro* e *in vivo*, con particolare riferimento alle antocianine, composti fenolici presenti in grande quantità in diversi frutti e vegetali. In questo studio abbiamo indagato la potenziale azione neurocitoprotettiva della cianidina-3-O-beta-glucopiranoside (Cy-3G) e del suo aglicone (Cy) in una linea di neuroblastoma umano (SH-SY5Y), nei confronti del danno ossidativo indotto dal perossido di idrogeno (H_2O_2). Allo scopo di determinare l'attività neurocitoprotettiva di Cy-3G e Cy è stato standardizzato un approccio integrato di test *in vitro* che ha permesso di valutare meccanismi cellulari diversi che sottendono il danno ossidativo, quali la formazione intracellulare di ROS, la riduzione dell'attività mitocondriale e l'induzione dell'apoptosi. La formazione di ROS e l'attività mitocondriale sono stati valutati, rispettivamente, con una sonda fluorescente ($H_2DCF-DA$) e con il metodo colorimetrico MTT. L'apoptosi è stata valutata quantificando la frammentazione del DNA con un metodo immunoenzimatico. Inoltre, è stata determinata la ripartizione dell'attività antiossidante totale (TAA) delle sostanze in studio tra la membrana cellulare e il citoplasma, mediante l'utilizzo del radicale ABTS. I risultati hanno indicato che il trattamento dei neuroni con Cy-3G (12,5-200 μM) e Cy (12,5-100 μM) è in grado di contrastare la formazione intracellulare di ROS e la diminuzione dell'attività mitocondriale in seguito al trattamento con H_2O_2 (300 μM). Nello stesso intervallo di concentrazione, Cy-3G e Cy sono in grado di inibire l'apoptosi indotta dal H_2O_2 . Confrontando l'attività neurocitoprotettiva di Cy-3G rispetto a Cy alla stessa concentrazione, si evidenzia un'attività nettamente superiore dell'aglicone rispetto al suo glicoside. I dati di ripartizione di TAA mostrano come i neuroni trattati con Cy-3G presentano un aumento di TAA solo a livello della membrana. Al contrario, i neuroni trattati con Cy evidenziano un aumento di TAA sia a livello della membrana che del citoplasma. Questi risultati dimostrano che la diversa attività neurocitoprotettiva delle sostanze in studio è da imputare molto probabilmente a differenze di tipo strutturale, che condizionano non solo la diversa stabilità e polarità delle molecole, ma anche la loro differente azione *scavenger*.

P57. I POLIFENOLI DELL'ESTRATTO DEL THE VERDE ATTENUANO IL DANNO POLMONARE IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI PLEURITE INDOTTA DA CARRAGENINA NEL TOPO

Muià C.¹, Mazzon E.¹, Di Paola R.¹, Genovese T.¹, Menegazzi M.², Zaffini R.², Suzuki H.², Cuzzocrea S.¹

¹*Dipartimento Clinico e Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Torre Biologica, Policlinico Universitario, Messina;* ²*Divisione di Biochimica, Dipartimento di Neuroscienze Visione, Università degli Studi di Verona*

Qui noi studiamo gli effetti dell'estratto del tè verde in un modello animale di infiammazione acuta, la pleurite indotta da carragenina. Riportiamo qui, che l'estratto del tè verde (dato a 25mg/kg 1h prima della carragenina), esercita un potente effetto antinfiammatorio in un modello animale di infiammazione acuta *in vivo*. L'iniezione di carragenina (2%) nella cavità pleurica del topo causa un'acuta risposta infiammatoria caratterizzata da accumulo di fluido nella cavità pleurica che contiene molti neutrofilo (PMNs), un infiltrazione di PMNs nel tessuto polmonare e un'aumentata produzione di nitriti/nitrati, e TNF- α (tumour necrosis factor alpha). Tutti i parametri infiammatori sono stati attenuati dal trattamento con estratto di tè verde. Inoltre, la carragenina induce una up-regolazione delle molecole d'adesione ICAM-1, così come la formazione di nitrotirosina e poly (ADP-ribose) sintasi (PARS), come determinato dall'analisi immunohistochemica del tessuto polmonare. La colorazione per ICAM-1, nitrotirosina, e PARS è stata ridotta dall'estratto di tè verde. I nostri risultati dimostrano chiaramente che il trattamento con l'estratto di tè verde esercita un effetto protettivo e offre un nuovo approccio terapeutico per il trattamento del danno polmonare.

P58. ATTIVITÀ PRO-APOPTOTICA DI COMPOSTI FENOLICI DI ORIGINE NATURALE IN LINEE TUMORALI UMANE

Nigro P., Bloise E., Piacente S., Pizza C., Leone A., Belisario M.A.

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno, Fisciano, Salerno

Le cellule tumorali sono caratterizzate da una deregolazione del delicato equilibrio tra stimoli proliferativi e segnali di morte programmata. È pertanto sempre più pressante la ricerca di nuove molecole di sintesi o di origine naturale in grado di interferire con la crescita tumorale inducendo morte cellulare per necrosi e/o apoptosi nelle cellule neoplastiche. È in questo contesto che si inserisce il presente studio teso a valutare l'attività citostatica di composti fenolici isolati dalla *Yucca Gloriosa* (composti 1-4) e *Y. Schidigera* (composti 5-8), piante originarie del Messico, contenenti un gruppo stilbenico relato al resveratrolo (RV), molecola di rilevante interesse biomedico. METODI. Il numero delle cellule vitali è stato quantizzato mediante dosaggio della fosfatasi acida endogena; il rilascio di lattico deidrogenasi (LDH) è stato usato come parametro di citotossicità; l'apoptosi è stata valutata in citofluorimetria: induzione di ipoploidia, saggio annessina V(A)/ propidio ioduro (PI) che consente di discriminare tra cellule francamente apoptotiche A^+/PI^- e cellule in apoptosi tardiva o necrosi A^+/PI^+ , depolarizzazione dei mitocondri; i livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono stati valutati mediante il marcatore fluorescente diclorofluoresceina diacetato. RISULTATI. La maggior parte dei composti è risultata inibire, a dosi micromolari, la proliferazione sia di linee cellulari leucemiche (U937, Jurkat, MOLT-4) sia, anche se con minore potenza, di linee derivanti da tumore solido (HepG2, MCF7). Sulla base delle IC_{50} , estrapolate dalle curve dose-effetto, i composti 3, 4 e 7 sono risultati più attivi del RV stesso. Tali composti, però, a differenza del RV, esplicano attività citostatica per lo più *via* induzione di morte cellulare e non attraverso induzione di blocco del ciclo cellulare. In particolare essi inducono morte cellulare per apoptosi (induzione di ipoploidia, depolarizzazione mitocondri, presenza di cellule francamente apoptotiche A^+/PI^-) e, in minore misura, per necrosi (rilascio LDH, presenza di cellule in apoptosi tardiva o necrosi A^+/PI^+). È noto che alterati livelli di ROS possono essere alla base sia dell'innescamento che esecuzione del processo apoptotico. Pertanto, allo scopo di verificare se la perturbazione dello *status* redox cellulare è uno dei meccanismi che sottendono l'attività citostatica e citotossica dei derivati della *Yucca*, è stato valutato l'effetto dei composti 3, 4 e 7 sui livelli basali di ROS in cellule (U937) non stimolate o esposte a sistemi generanti radicali. Il composto 4, e in minore misura i composti 3 e 7 sono risultati possedere, in dipendenza del tempo di trattamento e dose, sia attività anti- che pro-ossidante.

P59. UN RUOLO CRITICO DELL'ACIDO ARACHIDONICO NELLA PREVENZIONE DELLA FORMAZIONE PRECOCE DI LIVELLI APOPTOTICI DI PEROSSINITRITO NEGLI ASTROCITI ATTIVATI

Palomba L., Cantoni O.

Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi Carlo Bo, Urbino

Negli astrociti, il nitrossido (NO) viene prodotto da due distinte isoforme dell'enzima NO sintasi (NOS). Un'isoforma costitutiva (neuronale o NOS-I), la cui attività è regolata dal Ca^{2+} , e un'isoforma inducibile (NOS-II), la cui espressione prende luogo in seguito a specifica stimolazione, e.g. con lipopolisaccaride (LPS) e/o citochine come interferone-gamma (IFN-gamma). Queste sostanze regolano l'espressione genica mediata da alcuni fattori trascrizionali nucleari, come NF-kB. È noto che livelli fisiologici di NO (basali), come quelli prodotti dalla NOS-I, causano inibizione di NF-kB. Come conseguenza, l'espressione di NOS-II (o di altre proteine) si osserva solo quando le citochine e/o endotossine abbassano i livelli di NO al di sotto di un valore soglia. Il "cocktail" LPS/IFN-gamma è infatti in grado di ridurre tali livelli e di indurre l'espressione di NOS-II. In un recente lavoro abbiamo dimostrato che, in tali condizioni, l'acido arachidonico (AA) prodotto dall'isoforma citosolica dell'enzima fosfolipasi A_2 era responsabile dell'innescò del signalling (via attivazione di una tirosina chinasi) che determinava l'inibizione dell'enzima NOS-I. Utilizzando un approccio farmacologico e molecolare, abbiamo dimostrato che impedendo l'innescò del meccanismo inibitorio AA-dipendente, LPS/IFN-gamma perde la sua efficacia inibitoria nei confronti di NOS-I, e di fatto si trasforma in un potente attivatore di questo enzima. Dal momento che LPS/IFN-gamma evoca una precoce formazione di superossidi, via stimolazione della NADPH ossidasi, si creano pertanto i presupposti per la formazione di un potente ossidante, il perossinitrito. Questa ipotesi ha trovato conferma in studi in cui venivano parallelamente determinati, 10 min dopo esposizione a LPS/IFN-gamma, la produzione di NO, superossidi e nitrotirosine. Dopo 120 min si osservava un calo del potenziale di membrana associato a un calo di ATP e a liberazione di citocromo c e, successivamente (6 ore), una morte cellulare di tipo apoptotico. Questi effetti erano mediati dal perossinitrito. La supplementazione di livelli nanomolari di AA esogeno a cellule in cui l'attività fosfolipasica era inibita farmacologicamente, o geneticamente, preveniva la formazione di NO costitutivo e di perossinitrito, così come il danno mitocondriale e la morte cellulare. In conclusione, l'AA svolge negli astrociti attivati il duplice ruolo di permettere l'espressione di geni NF-kB-dipendenti e di prevenire la formazione precoce di livelli di perossinitrito in grado di indurre morte di tipo apoptotico.

P60. EFFETTI TOSSICI DELLA COCATROPINA

Pegorini S.², Zani A.², Limonta V.², Malabarba L.², Braida D.², Guerini-Rocco C.¹, Gori E.¹, Sala M.^{1,2}

¹*Centro di Farmacologia Comportamentale e delle Tossicodipendenze, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Milano;* ²*Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Milano*

Di recente sono stati segnalati in Italia e in alcuni paesi europei alcuni casi di avvelenamento da cocatropina, una micidiale associazione di cocaina e atropina che ha portato a episodi di grave intossicazione e anche a un decesso. Dal momento che è poco conosciuta la tossicità di questa miscela, ci si è proposti d'indagare nel ratto Wistar, gli effetti della cocatropina mescolando i due composti in proporzioni simili a quelle riscontrate nei casi di avvelenamento (cocaina 67%, atropina 33%). A tale scopo sono stati analizzati sia il profilo comportamentale che elettroencefalografico (EEG) in seguito a trattamento i.p. di cocaina (40 mg/kg), atropina (20 mg/kg) o di cocatropina, (cocaina 40 mg/kg + atropina 20 mg/kg). Per quanto concerne il profilo comportamentale sono state analizzate l'attività motoria spontanea in un'activity cage, la presenza o meno di convulsioni e la percentuale di letalità. Per quanto riguarda l'EEG, è stata calcolata la potenza totale spettrale e la distribuzione delle singole bande di frequenza (da 0,2 a 25Hz) in ratti svegli precedentemente impiantati a livello corticale con 5 elettrodi nell'area parieto-occipitale per le due ore successive al trattamento. È stato anche monitorata la temperatura corporea per 60 minuti, attraverso una sonda rettale, subito dopo il trattamento. Il trattamento acuto con cocatropina ha indotto: 1) convulsioni nel 60% e letalità nel 40% degli animali, effetti non riscontrati dopo somministrazione dei singoli composti; 2) un significativo incremento dell'attività motoria spontanea, paragonabile a quello osservato nel gruppo trattato con la sola cocaina; 3) un aumento della potenza spettrale e una significativa variazione nella distribuzione delle bande di frequenza (riduzione della banda delta e incremento delle bande theta e alfa). La temperatura corporea, come atteso, è incrementata nel gruppo di animali che hanno ricevuto la sola cocaina mentre non ha subito significative variazioni in seguito al trattamento con cocatropina. Al fine di individuare un possibile antidoto contro la tossicità indotta da cocatropina è stata utilizzata fisostigmina (1,5 mg/kg), somministrata i.p. 5 minuti prima della cocatropina. I risultati ottenuti indicano che l'anticolinesterasico è stato in grado di contrastare la comparsa delle convulsioni e della letalità. Il presente studio dimostra un effetto sinergico della cocaina e dell'atropina qualora vengano somministrate contemporaneamente per quanto concerne gli effetti tossici e letali e pone la base per un possibile impiego degli anticolinesterasici quale antidoto nell'avvelenamento da cocatropina.

Il presente studio è stato effettuato grazie al contributo della Regione Lombardia, Direzione Generale Famiglia e Solidarietà Sociale, nell'ambito del Progetto MDMA: monitoraggio sostanze e manifestazioni di abuso-implementazione di un sistema di allerta rapida sulla comparsa di nuove sostanze stupefacenti.

P61. IL RISK ASSESSMENT DEI PRODOTTI DA COMBUSTIONE DEI FITOFARMACI

Picciolo M., Andreoli C., Bassi A., Gobbi V., Lionetti G., Nunziata A.
Funzione Ricerca, BAT-Italia S.p.A., Napoli

I fitofarmaci sono una classe di sostanze chimiche utilizzate sia in agricoltura, nelle diverse fasi dalla semina alla raccolta fino alla conservazione, che come presidi sanitari negli ambienti confinati. Se da una parte l'uso dei fitofarmaci ha permesso sia la produzione di un quantitativo sufficiente di prodotti agricoli e di materie prime di qualità adeguata, che la produzione di raccolti in luoghi altrimenti inadeguati, dall'altro la maggior parte delle sostanze chimiche utilizzate come fitofarmaci ha un grado di rischio sia per gli utilizzatori che per i consumatori e per l'ambiente. Queste preoccupazioni, che riguardano anche i potenziali effetti cronici nell'uomo, negli animali e la persistenza nell'ambiente, sono alla base di tutte le normative di regolamentazione dell'uso dei fitofarmaci. La disponibilità di informazioni attendibili sulla tossicità e pericolosità di questi agenti chimici assunti attraverso la dieta può rendere più semplice il processo di valutazione del rischio. I dati, le informazioni e le valutazioni che interessano questo ambito sono numerose e sono messe a disposizione da parte di enti e istituzioni riconosciuti e accreditati. La quasi totalità di queste informazioni riguarda i fitofarmaci tal quali o loro metaboliti. I fitofarmaci possono essere immessi nell'ambiente e costituire una fonte di rischio per la salute umana anche nella forma combusta attraverso processi di incenerimento di prodotti agricoli, o in quanto residui nei prodotti alimentari durante la cottura, o per altri usi, come durante la combustione del tabacco nei prodotti da fumo. Durante la combustione, le molecole subiscono processi di degradazione (pirolisi e ossipirolisi) e processi di formazione (pirosintesi e addizione) che portano alla frammentazione in molecole più piccole e/o alla produzione di molecole nuove mediante aggregazioni. Il nostro lavoro presenta i risultati di un'analisi preliminare di risk assessment per famiglie chimiche di composti derivati dalla combustione di fitofarmaci d'uso comune, quali l'aldicarb, i piretroidi, i benzoimidazolici e carbammati, identificati mediante analisi termogravimetrica e contemporanea esecuzione di spettri di massa. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la degradazione termica di questi composti determina la formazione di piccole molecole, quali ossido di carbonio, acido cianidrico, metanolo, solfuro di metile, e di altre molecole quali n-nitroso derivati, nitroso derivati, composti solforati, composti alogenati e gruppi benzilici.

P62. UTILIZZO DI UN MODELLO *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA BIODISPONIBILITÀ DI ALCUNI VOCS PRESENTI NEL FUMO DI SIGARETTA

Poli D.^{1,2}, Vettori M.V.^{1,2}, Goldoni M.^{1,2}, Caglieri A.^{1,2}, Carnevali S.³, Franchini I.², Mutti A.²

¹*Centro Studi e Ricerche ISPESL, Università degli Studi di Parma;* ²*Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università degli Studi di Parma;* ³*Clinica per le Malattie dell'Apparato Respiratorio, Dipartimento Misto di Specialità Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Policlinico, Modena*

Background. Il fumo di sigaretta è una miscela complessa costituita da più di 3500 composti chimici, alcuni dei quali sono noti per avere proprietà tossiche e/o cancerogene. Recentemente è stato dimostrato che le sostanze volatili presenti nel fumo di sigaretta hanno la capacità di indurre citotossicità. *Scopo.* Caratterizzare la citotossicità dell'estratto di fumo di sigaretta (EFS) in relazione alla composizione della sua fase gassosa (VOCs), analizzata attraverso la tecnica della SPME/GC-MS (microestrazione su fase solida/gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa). *Materiali e metodi.* Tra le diverse sostanze presenti nel fumo di sigaretta, sono state scelte classi di sostanze note per avere una tossicità polmonare specifica e aventi una volatilità intrinseca specifica. Queste classi sono state raggruppate in: (a) idrocarburi aromatici (benzene, toluene, etilbenzene, xilene e stirene); (b) amine aromatiche (piridine, nicotina e nor nicotina); (c) idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (naftaline, florene, antracene, fenentrene, pirene, 1-metilpirene). Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando cellule A549 trattate con EFS. I campioni di medium per la stima della concentrazione dei composti in esame sono stati raccolti dopo 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 24 h. Parallelamente è stata valutata la vitalità cellulare. *Risultati.* I dati preliminari indicano che durante l'esposizione *in vitro*, la vitalità cellulare e la concentrazione delle sostanze volatili presenti nel fumo di sigaretta variano in modo tempo-dipendente, in accordo con le proprietà chimico-fisiche dei composti. La vitalità è del 70% dopo 1h, 50% dopo 1,5 h, 40% dopo 3h e del 27% dopo 24 h. Per quanto riguarda la volatilità, già dopo 1 h di trattamento la concentrazione degli idrocarburi aromatici cala velocemente a causa della loro volatilità intrinseca, passando da 100% (a t=0) a 10% (xilene) e 6% (benzene), dopo 24 ore, indicando una ridotta biodisponibilità per le cellule. Le amine aromatiche, per le loro proprietà basiche, sono risultate più solubili nel terreno di coltura e la loro volatilità è risultata ridotta (dopo 24 ore, si misura più del 60% della dose iniziale), indicando una maggiore biodisponibilità per le cellule. Lo stesso andamento è stato osservato per la classe degli IPA, che hanno mostrato una ridotta volatilità e proprietà non-polari che ne potrebbero aumentare la capacità citotossica. Dati preliminari finalizzati alla valutazione dell'assorbimento cellulare di queste classi di composti indicano che le amine aromatiche e IPA vengono rapidamente assorbiti dalle cellule. Al contrario, l'assorbimento degli idrocarburi aromatici risulta ridotto o assente. *Conclusioni:* I risultati preliminari di questo studio indicano che la volatilità e la polarità delle sostanze in esame sono dei parametri fondamentali da tenere in considerazione quando gli effetti dell'EFS

vengono studiati mediante un approccio sperimentale *in vitro*. Infatti, queste caratteristiche intrinseche delle sostanze in esame possono modificare il passaggio delle singole sostanze attraverso la membrana cellulare e quindi modificare la biodisponibilità.

Questa ricerca è stata finanziata dal MIUR (“A mechanistic research approach to in vitro methods for toxicity testing”; prot. 2004051890-002).

P63. DISREGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ CITOTOSSICA MEDIATA DALLE CELLULE *NATURAL KILLER* E DELLA PRODUZIONE DI CITOCHINE IN PAZIENTI CON ENDOMETRIOSI: RUOLO DEI PCB E DELLA DDE

Quaranta M.G.¹, Porpora M.G.³, Mattioli B.¹, Giordani L.¹, Libri I.¹, Ingelido A.M.², Cerenzia P.³, Di Felice A.³, Abballe A.², De Felip E.², Viora M.¹

¹Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Dipartimento di Scienze Ginecologiche, Perinatologia e Puericultura, Università degli Studi La Sapienza, Roma

L'endometriosi è una condizione patologica progressiva caratterizzata dall'impianto in sede ectopica di tessuto endometriale. In questo studio abbiamo valutato la funzionalità immunologica di pazienti con endometriosi e i livelli sierici dei policlorobifenoli (PCB) e di *p,p'*-diclorodifenildicloroetilene (*p,p'*-DDE) allo scopo di verificare l'impatto di tali contaminanti ambientali sulla regolazione delle funzioni immunitarie. Abbiamo osservato che la risposta proliferativa e la produzione di immunoglobuline da parte di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) non è alterata nelle pazienti con endometriosi, mentre l'attività citotossica mediata dalle cellule *natural killer* (NK) è significativamente ridotta nelle stesse pazienti rispetto ai controlli. Inoltre, abbiamo osservato una inibizione significativa della produzione di IL-1beta e di IL-12 nelle pazienti con endometriosi rispetto ai controlli. I livelli sierici di PCB (intesi come la somma dei congeneri più abbondanti nei tessuti umani) e di *p,p'*-DDE sono significativamente più elevati nelle donne con endometriosi rispetto al gruppo di controllo. In particolare, la concentrazione totale dei PCB di interesse nelle pazienti con endometriosi e nei controlli è rispettivamente 330 e 160 ng/g di grasso e quella del *p,p'*-DDE è di 770 e 310 ng/g di grasso. Inoltre, abbiamo osservato che i PBMC di soggetti normali trattati con PCB, *p,p'*-DDE o con la combinazione di diversi contaminanti ambientali mostrano una riduzione significativa dell'attività citotossica mediata dalle cellule NK e una significativa inibizione della produzione di IL-1beta e di IL-12. Questi risultati suggeriscono che nelle pazienti con endometriosi le alterazioni di alcuni parametri immunologici potrebbero essere correlate a elevati livelli sierici di PCB e di DDE.

Questo lavoro è stato supportato da un finanziamento del Ministero della Sanità N. OR/C.

P64. EFFETTI CITOSTATICI E CITOTOSSICI DELL'ISOTIOCIANATO SULFORAFANE SU LINEE CELLULARI CARATTERIZZATE DA UN DIVERSO STATUS MOLECOLARE DEL GENE P53

Sciuscio D., Fimognari C., Cantelli Forti G., Hrelia P.

Dipartimento di Farmacologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Il gene p53 codifica per un fattore di trascrizione che gioca un ruolo fondamentale nel controllo del ciclo cellulare e nell'induzione di apoptosi in seguito a stress genotossici. Questo gene risulta essere mutato in una percentuale altissima di tumori umani e ciò è responsabile, in parte, dell'insorgenza di resistenza nei confronti delle varie terapie adottate. La scoperta di molecole che agiscano indipendentemente da questo gene è uno degli obiettivi verso cui la ricerca degli ultimi anni si è focalizzata. Il sulforaphane (SUL) è una molecola di origine naturale dotata di numerose proprietà: è in grado a esempio di indurre apoptosi e di modulare il ciclo cellulare di cellule tumorali. Nonostante l'apoptosi mediata dal SUL sia un processo noto ormai da tempo, il coinvolgimento del gene p53 è ancora da chiarire. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'induzione di apoptosi SUL-mediata su tre linee cellulari caratterizzate da un differente status molecolare del gene p53. Sono state utilizzate tre linee cellulari di fibroblasti murini caratterizzate da: un p53 normale (linea F1), mutato a livello del codone 220 (F10) e knock-out (F5). Le cellule sono state trattate con differenti concentrazioni di SUL (0,0-50,0 μM). L'IC50 associata al trattamento è stata valutata tramite il test di esclusione del trypan blue, mentre la capacità pro-apoptotica del SUL è stata valutata tramite la determinazione citofluorimetrica dell'attività della caspasi-3. Le linee cellulari adottate sembrano avere una differente sensibilità nei confronti del SUL. Infatti, mentre le cellule F1 e F10 esibiscono un livello di IC50 paragonabile (F1: IC50 26,12 μM ; F10: IC50 25,80 μM), le cellule F5 richiedono una quantità di SUL una volta e mezzo superiore per causare lo stesso effetto inibente. L'analisi citofluorimetrica dell'attività della caspasi-3 ha fornito risultati analoghi. Dopo 24 h di trattamento con SUL 50 μM , la percentuale di cellule apoptotiche risulta essere del 78% per le cellule F1, 69% per le cellule F10 e 67% per le cellule F5. Nel loro insieme, i nostri risultati indicano che il SUL è in grado di inibire la crescita di fibroblasti murini caratterizzati da un diverso status molecolare del gene p53 attraverso l'induzione di apoptosi. L'induzione di apoptosi osservata anche in cellule knock-out supporterebbe un meccanismo p53 indipendente alla base dell'attività pro-apoptotica del sulforafane. Ciò, se supportato da ulteriori evidenze sperimentali, potrebbe rendere la molecola potenzialmente utile nel trattamento di tutti quei tumori caratterizzati da un'alterazione molecolare del gene p53.

P65. MECCANISMI DEL DANNO NEURONALE INDOTTO DALLA TOSSINA MITOCONDRIALE SODIO AZIDE IN COLTURE PRIMARIE DI CORTECCIA CEREBRALE DI RATTO. EFFETTI SULLE PROTEIN KINASI C

Selvatici R.¹, Falzarano S.¹, Franceschetti L.¹, Marino S.², Marani L.², Previati M.³, Lanzoni I.³, Siniscalchi A.²

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Genetica Medica, Università degli Studi di Ferrara; ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Ferrara; ³Dipartimento di Morfologia ed Embriologia, Sezione di Anatomia Umana, Università degli Studi di Ferrara

La tossina mitocondriale sodio azide (NaN_3) costituisce un'alternativa all'intossicazione con glutammato (Glu) nelle colture neuronali, per mimare condizioni di ischemia cerebrale e per identificare i meccanismi coinvolti nella neurotossicità. Esistono molte evidenze sperimentali a supporto di un legame fra concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), grado di attivazione delle protein chinasi C (PKC) e morte neuronale, ma la sequenza di eventi e il coinvolgimento delle singole isoforme PKC non sono ancora chiariti. Colture primarie di corteccia cerebrale di ratto (7-9 DIV) sono state trattate con NaN_3 10 mM per 5 min (ischemia chimica). I livelli di PKC sono stati valutati mediante Western Blotting, 30 min e 24 ore dopo il trattamento. Nei campioni di controllo, tutte le isoforme PKC prese in esame (α , β_1 , β_2 , γ , δ , ϵ) sono state rilevate. Nelle colture cellulari sottoposte a ischemia chimica, 30 min dopo il trattamento si ha una riduzione dei livelli totali delle isoforme PKC α ($52 \pm 18\%$ del controllo), β_1 ($38 \pm 8\%$), γ ($56 \pm 5\%$) e δ ($43 \pm 17\%$), mentre i livelli delle isoforme β_2 e ϵ risultano invariati. Il grado di traslocazione in membrana (indice di attivazione) rimane sostanzialmente invariato per tutte le isoforme. Il trattamento con NaN_3 10 mM fa aumentare la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, valutata con FURA2, al $129 \pm 8\%$ del controllo ($P < 0,05$), e l'efflusso di ^3H aspartato, indice della liberazione di Glu, al $140 \pm 3\%$ ($P < 0,05$). Per valutare se le variazioni a carico delle PKC dipendessero dall'incremento nella $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e/o dall'attivazione dei recettori NMDA del Glu, sono stati testati gli effetti del chelante del Ca^{2+} intracellulare, BAPTA (1 mM), e dell'antagonista NMDA, MK801 (1 μM). Le variazioni indotte dall'ischemia chimica sulle isoforme α e β_1 , ma non γ e δ , risultano Ca^{2+} -dipendenti e richiedono l'attivazione dei recettori NMDA. L'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e la riduzione dei livelli delle isoforme PKC α e β_1 non sono più rilevabili 24 ore dopo il trattamento con NaN_3 , mentre si mantiene la riduzione dei livelli di γ e δ . A questo tempo di osservazione il numero di cellule vitali (determinato con MTT) è ridotto a $44 \pm 3\%$ del controllo. Il meccanismo di morte cellulare è riconducibile al danno mitocondriale, come evidenziato dalla fluorescenza della sonda JC-1, ma la marcatura dei nuclei con DAPI e con annessinaV non rivela fenomeni di frammentazione nucleare. Questi dati indicano che le varie isoforme PKC sono coinvolte in maniera differente nel danno neuronale indotto da NaN_3 .

P66. STUDIO DEGLI EFFETTI SULLA FUNZIONE TIROIDEA DEL CLORPIRIFOS IN TOPI CD1 TRATTATI NELLE FASI DI SVILUPPO PRE- E POST-NATALE: DATI PRELIMINARI

Tassinari R.¹, De Angelis S.², Gilardi E.¹, Moracci G.¹, Maranghi F.¹, Capone F.¹, Venerosi A.², Mantovani A.¹, Olivieri A.², Calamandrei G.²

¹Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma;

²Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione: evidenze sperimentali suggeriscono come alcune sostanze utilizzate in agricoltura: fungicidi, erbicidi o biocidi, siano in grado di interferire con la funzione endocrina. La tiroide rappresenta uno dei principali bersagli di alcuni *Interferenti Endocrini*. In particolare, vi è un crescente interesse nei confronti degli effetti tireostatici di insetticidi ampiamente utilizzati in campo agricolo e nelle disinfestazioni, quali gli organofosforici. Il Clorpirifos (CPF) è un potente inibitore dell'acetilcolinesterasi; recentemente, sulla base di studi condotti su modelli sperimentali, è stata ipotizzata anche una azione tireostatica. Obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto sulla funzione tiroidea dell'esposizione pre- e post-natale al CPF nel topo CD1. *Materiali e metodi:* 30 topine gravide sono state suddivise in 3 gruppi trattati mediante gavaggio dal giorno di gravidanza 15° al 18° con le seguenti dosi di CPF (veicolo olio di mais): gruppo C: 0 mg/kg/pc/die; gruppo T: 3 mg/kg/pc/die; gruppo T1: 6 mg/kg/pc/die. Le femmine sono state lasciate partorire spontaneamente. 10 neonati per sesso e per gruppo di trattamento post-natale randomizzati alla nascita sono stati trattati per via sottocutanea dal giorno post-natale (PN) 11 al 14 (giorno del parto PN 0) con le seguenti dosi di CPF: gruppo C_n: 0 mg/kg/pc/die; gruppo T_n: 3 mg/kg/pc/die; gruppo T1_n: 3 mg/kg/pc/die. Al PN 150 è stato prelevato il sangue per la valutazione degli ormoni tiroidei, successivamente i topi sono stati sacrificati, è stata prelevata la tiroide per l'esame istologico e istomorfometrico. *Risultati:* nei 2 gruppi di femmine esposte sia prenatalmente che postnatalmente non sono state osservate differenze significative per ciò che riguarda i livelli sierici di T3 e T4, la valutazione istologica e le misurazioni istomorfometriche. Al contrario, nel gruppo di maschi con esposizione pre- e post-natale alla dose di CPF 3 mg/kg/pc/die è stata osservata una significativa riduzione dei livelli sierici di T3 (1,0±0,2 vs 1,2±0,2 ng/ml, P=0,01). L'esame istologico non ha evidenziato alterazioni; per contro, l'analisi istomorfometrica ha evidenziato una significativa riduzione percentuale del numero di follicoli tiroidei (-29%) sempre nei maschi con esposizione pre- e post-natale alla dose di CPF 3 mg/kg/pc/die. *Conclusioni:* i dati indicano una possibile azione inibitoria del CPF sulla sintesi degli ormoni tiroidei nei maschi. La presenza di un effetto nel gruppo trattato al livello di esposizione prenatale inferiore (gruppo T_n) potrebbe, qualora fosse confermata, suggerire l'induzione di fenomeni di adattamento a esposizioni più elevate. Questi risultati preliminari indicano che i potenziali effetti endocrini del CPF meritano ulteriori indagini.

P67. I MICRODOMINI LIPIDICI CONTRIBUISCONO ALLE MODIFICAZIONI MITOCONDRIALI ASSOCIATE ALL'APOPTOSI IN CELLULE T

Tinari A.¹, Garofalo T.², Giammarioli A.M.³, Misasi R.², Manganelli V.², Gambardella L.³, Pavan A.⁴, Sorice M.^{1,4}, Malorni W.³

¹Dipartimento di Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli Studi La Sapienza, Roma; ³Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ⁴Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi dell'Aquila; ⁴Laboratorio di Medicina Sperimentale e Patologia Ambientale, Rieti

I microdomini lipidici della membrana plasmatica, costituiti principalmente da gangliosidi, sono stati considerati come una specie di “camera chiusa”, dove avvengono una serie di attività subcellulari, compreso il segnale proapoptotico mediato da CD95/Fas. È stato riportato che l’attivazione di questo recettore induce un flusso intracellulare del ganglioside GD3 propagando il segnale apoptotico e agendo sulla permeabilità mitocondriale e il rilascio di fattori apoptogenici. In questo lavoro abbiamo analizzato gli eventi intracellulari che seguono il segnale pro-apoptotico “fisiologico”, cioè CD95/Fas, in cellule T. L’analisi morfologica con microscopia confocale dell’espressione e della distribuzione di GD3 rivelava la presenza del ganglioside, oltre che sulla membrana cellulare, in compartimenti citoplasmatici corrispondenti ai mitocondri. L’associazione di GD3 ai mitocondri era confermata dall’immuno microscopia elettronica a trasmissione che evidenziava strutture ben organizzate (microdomini) associate con le creste interne. Inoltre, l’analisi dei gangliosidi estratti dai mitocondri isolati indicava un incremento significativo di GD3 dopo stimolo con CD95/Fas. Per verificare l’ipotesi che queste strutture altamente dinamiche possano essere porzioni specializzate delle membrane mitocondriali che regolano l’esecuzione della cascata apoptotica, abbiamo studiato i rapporti di GD3 con la proteina VDAC-1, la proteina di fissione hFis e le proteine pro-apoptotiche Bax e la forma attiva di Bid, t-Bid. I nostri risultati hanno dimostrato che GD3, VDAC-1 e hFis1 sono componenti strutturali di un complesso segnale multimolecolare. Per studiare il contributo dei microdomini lipidici mitocondriali nell’apoptosi regolata da GD3, abbiamo valutato, per mezzo della citometria a flusso, i cambiamenti di potenziale di membrana in mitocondri isolati dopo incubazione con GD3. I risultati di tali esperimenti indicavano che GD3 era da solo in grado di indurre una perdita significativa di $\Delta\psi$ (delta psi). Infine, la distruzione con methyl-beta-cyclodextrina dei microdomini lipidici in mitocondri isolati preveniva la depolarizzazione mitocondriale indotta da GD3 o da t-Bid, suggerendo che la perdita di $\Delta\psi$ durante l’apoptosi possa dipendere dall’interazione di GD3 o t-Bid con i microdomini lipidici mitocondriali. In conclusione, i mitocondri sembrano essere organelli subcompartimentalizzati in cui i microdomini potrebbero avere il ruolo di controllori dei loro programmi apoptogenici, incluse le modificazioni morfologiche associate alla fissione e la formazione di megapori. I nostri risultati sembrano suggerire che i microdomini lipidici associati ai mitocondri possono agire come regolatori del destino cellulare.

P68. RUOLO DELLA 5-LIPOSSIGENASI NEL SIGNALLING CITOPROTETTIVO INNESCATO DAL PEROSSINITRITO IN CELLULE U937

Tommasini I., Guidarelli A., Palomba L., Cantoni O.

Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi di Carlo Bo, Urbino

Precedenti studi condotti nel nostro laboratorio indicano che concentrazioni sub-tossiche di perossinitrito inducono, in cellule appartenenti al lineaggio monocitico/macrofagico, lesioni mitocondriali in grado di evocare transizione della permeabilità della membrana mitocondriale interna (MPT), che viene tuttavia prevenuta da un parallelo signalling citoprotettivo. Questo signalling viene innescato dall'acido arachidonico (AA), liberato a seguito dell'attivazione della fosfolipasi A₂ citosolica. Successivamente, è stato dimostrato che l'AA media la traslocazione della proteina chinasi C α (PKC α) dal citosol al mitocondrio, un evento associato alla traslocazione citosolica di Bad e quindi alla prevenzione della MPT e alla sopravvivenza cellulare. Il presente studio è stato condotto con il fine di stabilire se tali effetti erano direttamente mediati dall'AA oppure da prodotti del metabolismo dell'AA, i.e. da metaboliti della cicloossigenasi e lipossigenasi. Utilizzando inibitori farmacologici e cellule transfettate con oligonucleotidi antisense è stato possibile determinare che la 5-lipossigenasi (5-LO) svolge un ruolo critico nel signalling citoprotettivo sopra descritto. L'interruzione del signalling a livello della 5-LO, o della proteina attivante la 5-LO, provocava inibizione della traslocazione mitocondriale di PKC α e della traslocazione citosolica di Bad e, quindi, una rapida necrosi dipendente da MPT. La supplementazione di concentrazioni nanomolari di acido 5-idrossieicosatetraenoico (5-HETE), il prodotto della 5-LO, preveniva tutte queste risposte. Questi risultati identificano il 5-HETE (o prodotti a valle di esso) come molecola segnale endogena che previene (attraverso un meccanismo PKC-dipendente) la localizzazione mitocondriale di Bad, e la necrosi MPT-dipendente, in cellule esposte a concentrazioni non tossiche (ma tuttavia MPT-committing) di perossinitrito.

P69. ANALISI DEI POLIMORFISMI DELLE GST COME POSSIBILI FATTORI DI SUSCETTIBILITÀ ALL'INSORGENZA DELLA ENDOMETRIOSI

Vichi S.¹, Gemma S.¹, Porpora M.G.², Ferro A.², De Felip E.¹, Testai E.¹

¹Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Policlinico Umberto I, Cattedra di Ostetricia e Ginecologia, Roma

L'endometriosi è una patologia ginecologica multifattoriale con eziopatogenesi ancora incerta, che in Italia interessa più del 10% delle donne in età fertile. Una ipotesi, non ancora confermata, è che esista una correlazione tra l'insorgenza di endometriosi e l'esposizione alimentare ad alcuni idrocarburi aromatici polialogenati, come i policlorobifenili (PCB) e alcuni dei loro metaboliti idrossilati o le diossine in grado di esercitare una azione simil-ormonale. La patologia è caratterizzata da degenerazione ciclica e infiammazione cronica del tessuto endometriosico, con conseguente presenza di elevate concentrazioni di ROS e prodotti dello stress ossidativo, nella cui detossificazione hanno un ruolo rilevante le Glutazione Transferasi (GST) M1, T1 e P1, espresse a livelli apprezzabili nell'endometrio. Le GST M1 e T1 sono caratterizzate da polimorfismi con totale delezione del gene e conseguente assenza della proteina e della attività correlata. L'incidenza dei soggetti GSTM1(-) e GSTT1(-) nella popolazione caucasica è rispettivamente del 50% e del 20%. Il polimorfismo funzionale della GSTP1 (GSTP1^{lle}) è dovuto a una mutazione puntiforme nel codone 105 (Ile¹⁰⁵→Val¹⁰⁵) e nel caso delle ROS è stata ipotizzata una maggiore attività detossificante della proteina mutata, presente nel 4-16% e nel 30-50% di soggetti caucasici omozigoti e eterozigoti. In letteratura alcuni studi (generalmente a numerosità limitata) riportano risultati contrastanti sul possibile ruolo delle varianti alleliche delle GST nell'insorgenza di endometriosi. Per verificare la possibilità che polimorfismi delle GST potessero rappresentare un fattore metabolico di suscettibilità alla patologia nella popolazione italiana è stata condotta una analisi dei genotipi (mediante PCR e RFLP) su campioni ematici, raccolti presso il Policlinico Umberto I^o, provenienti da volontarie sane (n=144) e da pazienti con diagnosi laparoscopica di endometriosi (n=142), arruolate in uno studio caso-controllo. I risultati ottenuti indicano che la distribuzione dei polimorfismi nei soggetti di controllo è sovrapponibile a quanto finora descritto in letteratura; non è stato tuttavia identificato un ruolo per i polimorfismi delle GST come fattori di suscettibilità, né singolarmente né in combinazione tra loro. Nessuno degli O.R. raggiunge infatti la significatività statistica, anche se tendenzialmente soggetti GSTM1(-) sembrano avere un rischio maggiore di contrarre la malattia (O.R.=1,53 C.I.=0,96-2,46), mentre la delezione della GSTT1 sembra esercitare un ruolo protettivo (O.R.=0,70 C.I.=0,37-1,33). La multifattorialità della endometriosi suggerisce la necessità di analizzare altri polimorfismi possibilmente rilevanti per la patologia (es: aromatasi) o per il metabolismo dei contaminanti la cui esposizione è stata associata alla sua insorgenza (es: CYP1A1, UDPGT e SULT) e incrociarli con i dati di esposizione a PCB relativi alla popolazione oggetto dello studio.

P70. EFFETTI COMPORTAMENTALI DI ESPOSIZIONE PERINATALE A PCB126 E METILMERCURIO

Vitalone A.¹, Catalani A.², Chioldi V.², Cinque C.², Fattori V.¹, Giacomi A.², Matteucci P.², Zuena A.R.², Costa L.G.³

¹Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università degli Studi di Bari;

²Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università degli Studi La Sapienza,

Roma; ³Dipartimento di Anatomia Umana, Farmacologia e Scienze Medico Forensi, Università degli Studi di Parma

Studi epidemiologici e di laboratorio suggeriscono che i policlorobifenili (PCBs) e il metilmercurio (MeHg), riscontrati quali contaminanti del pesce di grossa taglia, potrebbero esercitare effetti tossici additivi o sinergici sullo sviluppo del SNC. Scopo del lavoro è valutare la possibile neurotossicità di basse dosi di PCB126 (100 ng/kg/die) nel cibo, di MeHg (0,5 mg/kg/die) nell'acqua da bere e della loro associazione (PCB-MeHg) nella progenie di ratte Wistar, trattate dal giorno gestazionale 7 al giorno post-natale (PND) 21. Ratti di entrambi i sessi sono stati esaminati a diverse età, per: 1) presenza di deficit di attenzione (sudden silent test, PND40); 2) alterazioni dell'attività locomotoria (open field test, PND30, 110, 210); 3) coordinazione ed equilibrio (rotarod test, PND90); 4) capacità esplorativo-discriminativa (novel object test, PND80); 5) presenza di ansia (elevated plus maze test, PND100). Non è emersa alcuna differenza tra i gruppi nella capacità di attenzione. È stato evidenziato un aumento dell'attività locomotoria nei maschi PCB126, a partire dal PND 110, consistente in un aumento nei cambi di direzione all'interno dell'arena e in un incremento nel numero di rearing. Nelle femmine PCB126 e PCB-MeHg è emerso un aumento dell'attività locomotoria totale e delle stereotipie, a partire dal PND210. Non sono stati evidenziati deficit di coordinazione e di equilibrio nei diversi gruppi. Nei maschi MeHg è emersa una maggiore reattività alla manipolazione da parte dello sperimentatore. Non sono state riscontrate differenze tra i gruppi e i sessi nella capacità discriminativa tra due oggetti. La percentuale di entrate e di tempo trascorso nei bracci aperti (misura dell'ansia) si è dimostrata simile in tutti i gruppi. Nei ratti maschi PCB126 e nelle femmine PCB-MeHg è stato osservato un aumento nel numero di entrate totali nei bracci del maze, indice di una maggiore attività locomotoria. Alle dosi somministrate e ai tempi analizzati non è emersa alcuna neurotossicità significativa, ascrivibile a un effetto additivo del PCB126 e del MeHg. È stato evidenziato un lieve incremento dell'attività locomotoria (PND100 e PND210) nelle femmine PCB126 e PCB-MeHg (essenzialmente aumento delle stereotipie) e nei maschi PCB126 (principalmente aumento dei rearing). L'iperattività riscontrata in questi gruppi di animali non è accompagnata da alterazioni nella capacità di attenzione. Tale situazione sembrerebbe somigliante all'Attention Deficit Hyperactivity Disorder con classificazione di comportamento "Predominantly Hyperactive-Impulsive Type" (e non "Inattentive Type"). Ulteriori studi sono necessari al fine di chiarire se le lievi alterazioni riscontrate nell'attività locomotoria subiscano o meno un aggravamento in funzione dell'età dell'animale.

9 FEBBRAIO 2006

P71. LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO CANCEROGENO PER L'UOMO DEI FARMACI ANTIIPERTENSIVI NON SEMPRE È ADERENTE ALLE LINEE GUIDA

Brambilla G., Martelli A.

Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Clinica, Università degli Studi di Genova

Le linee guida per la valutazione dell'attività genotossica e cancerogena dei farmaci richiedono l'esecuzione di un test *in vitro* per la mutazione genica nei batteri, di un test *in vitro* su cellule di mammifero del danno cromosomico e/o di mutazione genica, un test *in vivo* per le aberrazioni cromosomiche in cellule ematopoetiche di roditori, e una prova di cancerogenesi in due specie (di regola topo e ratto). L'edizione del 2002 del MartinDale – The Complete Drug Reference riporta le monografie di 164 farmaci antiipertensivi, la maggior parte dei quali è in commercio in diversi paesi. Considerata l'importanza della valutazione del rischio genotossico-cancerogeno per l'uomo, è stata effettuata una estensiva ricerca dei risultati degli studi di genotossicità e di cancerogenesi effettuati sui farmaci antiipertensivi. Detta ricerca è stata condotta sia sulle riviste del settore, sia sul Physician's Desk Reference e su Micromedex, sia sui siti internet di numerose banche dati. Essa ha messo in evidenza che di 65 (39,6%) dei 164 antiipertensivi in commercio non è disponibile alcun risultato di studi di genotossicità e di cancerogenesi, ma si deve considerare che essi sono presenti solo in alcuni paesi. Per gli altri 99 (60,4%) esiste almeno un risultato: 51 hanno fornito risposte negative e 48 almeno una risposta positiva; di questi ultimi 32 sono risultati positivi in almeno un test di genotossicità; 26 in almeno un test di cancerogenesi, e 10 in almeno uno di entrambi i tipi di test. Relativamente alla capacità dei test di genotossicità di prevedere l'attività cancerogena, dei 75 antiipertensivi con dati sia di genotossicità che di cancerogenesi, 37 sono non genotossici e non cancerogeni, 14 genotossici ma non cancerogeni, 14 non genotossici ma cancerogeni, e 10 genotossici e cancerogeni. Tuttavia, solo 42 antiipertensivi hanno tutti i risultati previsti dalle linee guida, e i dati disponibili di altri 26 sono insufficienti a una valutazione attendibile del rischio in quanto insufficienti o contraddittori.

P72. STUDI MULTISITO – L'ESPERIENZA DI UNA CRO

Brunetti M.M.

Research Toxicology Centre, RTC S.p.A, Pomezia, Roma

La conduzione di uno studio come studio multisito ormai non è più limitata agli studi sul campo, ma è una realtà che riguarda qualsiasi tipologia di studio non clinico di laboratorio. Attualmente, moltissimi studi di tossicologia includono fasi sperimentali condotte presso sedi diverse, sia di pertinenza della stessa azienda sia di pertinenza di aziende diverse. L'OECD Consensus Document No. 13, *The Application of the OECD Principles of GLP to Organisation and Management of Multi-Site Studies*, è una linea guida indispensabile per la corretta conduzione di uno studio come studio multisito. Tuttavia il documento, come tutte le linee guida, si presta a interpretazioni diverse, sia da parte dell'ente regolatorio sia da parte dei centri di saggio. Il poster è mirato a evidenziare problematiche affrontate durante la conduzione di studi multisito dalla RTC, una CRO che opera in ambito internazionale e che quindi si trova a interagire sia con procedure e interpretazioni differenti da parte dei vari clienti nazionali e internazionali, sia con richieste diverse da parte di diversi enti regolatori. Saranno riportati esempi di aspetti problematici riscontrati e relative possibili soluzioni.

P73. REAZIONI AVVERSE DURANTE SOMMINISTRAZIONE DI N-ACETILCISTEINA A SCOPO ANTIDOTICO: EFFETTO DELLA RIDUZIONE DELLA VELOCITÀ DI INFUSIONE DELLA DOSE INIZIALE

Butera R., Lonati D., Giampreti A., Petrolini V., Zancan A., Locatelli C., Manzo L.
Servizio di Tossicologia, Centro Antiveleni, Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, IRCCS, Fondazione Maugeri e Università degli Studi di Pavia

Introduzione. La N-acetilcisteina (NAC) è antidoto generalmente considerato sicuro. Tuttavia, durante somministrazione della dose iniziale è possibile l'insorgenza di effetti avversi (ADR) di natura anafilattoide. È stata ipotizzata una correlazione tra velocità di infusione della dose iniziale e insorgenza di ADR. *Obiettivo.* Valutare l'incidenza di ADR a NAC per somministrazione della dose iniziale in 90 minuti. *Materiali e metodi.* Sono stati studiati tutti i pazienti trattati con NAC a dosi antidotiche nell'arco di sei mesi. In tutti i pazienti, la dose iniziale (150 mg/kg) è stata somministrata per via endovenosa in 90 minuti. Gli eventi avversi sono stati classificati mediante score di gravità. Sono stati analizzati i fattori di rischio per comparsa di ADR, e i trattamenti farmacologici concomitanti in grado di interferire con l'insorgenza di ADR. I risultati sono stati confrontati con i controlli storici della letteratura, a esclusione degli studi nei quali la NAC è stata somministrata per via orale. *Risultati.* Su un totale di 42 pazienti eligibili nello studio, 2 sono stati esclusi per incompletezza dei dati. Sono stati analizzati 40 pazienti, trattati con NAC a dosi antidotiche per intossicazione da paracetamolo (23/40, 57,5%), da solventi (13/40, 32,5%), o per altra patologia da causa tossica (4/40, 10%). Tra i fattori di rischio analizzati, è stato registrato 1 caso di asma bronchiale; 4 pazienti risultavano in trattamento con antiistaminici anti-H₂, e 9 con antiinfiammatori e/o cortisonici. Eventi avversi a NAC sono stati osservati in un solo caso (1/40, 2,5%). Analizzando il solo gruppo di pazienti senza trattamenti farmacologici concomitanti in grado di prevenire o attenuare l'insorgenza di effetti avversi, l'incidenza ADR a NAC è stata del 3,7% (1/27). La reazione è stata di lieve entità (flushing), non ha richiesto terapia specifica e non ha comportato la sospensione del trattamento antidotico. *Discussione.* I protocolli standard prevedono la somministrazione della dose iniziale di NAC in 15 - 30 minuti. Tale velocità di infusione è associata a un'incidenza di ADR che negli studi retrospettivi varia tra il 5,3 e l'11%, e risulta 3 volte superiore nei soggetti asmatici. Due studi prospettici hanno documentato che la riduzione della velocità di infusione della dose iniziale da 15 a 60 minuti comporta una diminuzione dell'incidenza di ADR dal 56,0% al 19,6%. I risultati del nostro studio confermano queste osservazioni e suggeriscono che l'ulteriore riduzione della velocità di infusione della dose iniziale, somministrata in 90 minuti, sia associata a un'incidenza di effetti avversi ancora minore.

P74. PRELIEVI SANGUIGNI SERIALI PER LE VALUTAZIONI TOSSICOLOGICHE E TOSSICOCINETICHE NEGLI STUDI PRECLINICI SU RATTO (COMPOSITE PROFILE): VALUTAZIONE DELL'IMPATTO SUI PARAMETRI EMATOLOGICI

Casartelli A., Vandin L., Masotto I., Bonafini S.
Safety Assessment Department, GSK Research Centre, Verona

Durante lo sviluppo preclinico di un farmaco, il “composite profile” rappresenta una procedura di prelievo sanguigno applicata agli studi nel ratto che permette un notevole risparmio di animali. Con questo approccio, all'ultimo giorno di trattamento, i prelievi seriali per la valutazione tossicocinetica (TK) vengono eseguiti sugli stessi animali sui quali viene eseguita la valutazione tossicologica, anzichè usare due gruppi separati di animali. Normalmente, ogni gruppo di trattamento ha 4 animali, e vengono eseguiti in media da 6 a 8 prelievi TK un giorno prima del prelievo per la valutazione tossicologica; ciò corrisponde a 0,3 mL di sangue raccolti da due animali ogni prelievo, per un totale di 3-4 prelievi per animale. Lo scopo di questo studio è quello di valutare l'impatto di questo approccio sui parametri ematologici misurati nella valutazione tossicologica confrontando i dati ematologici di ratti che hanno subito solo la procedura di prelievi seriali con i dati di ratti di controllo, senza prelievi seriali. In questo lavoro, i dati di ematologia di 31 ratti non trattati raccolti in 6 differenti studi tossicologici in cui è stato applicato il “composite profile” sono stati confrontati con una banca dati composta da 359 campioni di ratto di controllo; tutti i campioni considerati appartengono a ratti di ceppo Sprague Dawley, sia maschi che femmine, di età compresa tra 11 e 16 settimane. È stata evidenziata una tendenza al calo della conta eritrocitaria (RBC), dell'emoglobina (HGB) e dell'ematocrito (HCT), e un leggero aumento del volume corpuscolare medio (MCV) e della conta dei reticolociti (RET). Le alterazioni a carico di RBC, HGB, HCT e RET sono significative al test di Student sia nei maschi che nelle femmine, suggerendo che la procedura di prelievo seriale (composite profile) ha un leggero effetto sui principali parametri ematologici; tuttavia, tutti i valori rimangono entro il range di variabilità considerato normale per il ratto Sprague Dawley sano di paragonabile età.

P75. VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA DI DUE NUOVI INIBITORI DELLA DHFR DEL *PLASMODIUM FALCIPARUM* E DEL *PLASMODIUM VIVAX*

Coppi A.¹, Rastelli G.², Ulivi P.³, Ruberto A.I.¹, Baggio G.¹, Rossi T.¹

¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena; ²Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena; ³Laboratorio Biologico, Divisione di Oncologia, Ospedale Pierantoni, Forlì

Secondo una segnalazione del 2004 dell'UNICEF "La malaria uccide più di un milione di persone all'anno". Questa parassitosi è sempre più diffusa anche nel continente europeo a causa sia dei viaggi che sempre più persone compiono ogni anno verso le zone endemiche, sia per il fenomeno dell'immigrazione dalle medesime zone. La patologia prevede un lungo trattamento con farmaci che agiscono a diversi livelli del ciclo vitale del *Plasmodium* all'interno dell'uomo. Gli antifolati sono una classe di antimalarici che agiscono sulla via biosintetica del folato dei vari Plasmodi inibendo gli enzimi in essa coinvolti. Sono farmaci estremamente sfruttati e, per questo motivo spesso inefficaci a causa dell'insorgenza di ceppi di *Plasmodium* divenuti resistenti. Oltre a ciò, nostri studi recenti *in vitro* hanno evidenziato la capacità di alcuni antimalarici di interferire con la replicazione di cellule sane e cellule tumorali. In particolare, alcuni antimalarici potrebbero fungere da promotori per forme tumorali diffuse come il carcinoma mammario. Per la presenza di gravi effetti collaterali e di ceppi resistenti, diviene sempre più urgente la necessità di disporre di nuovi farmaci antimalarici. Nel presente studio sono state utilizzate due molecole di nuova sintesi non analoghe del folato, ma in grado di inibire la DHFR (diidrofolato reductasi) del *Plasmodium falciparum* e del *Plasmodium vivax* con una IC₅₀ compresa nel range micromolare e sub-micromolare. I composti, siglati come 1B e 6G sono rispettivamente una molecola N-idrossiamidina simile e un derivato della tiourea e sono stati saggiati in modo comparativo con l'antifolato pirimetamina nei confronti di cellule VERO e cellule MCF-7 (tumore mammario). Le cellule sono state coltivate sterilmente in piastre con terreno EMEM arricchito. Al raggiungimento della semiconfluenza, sono state aggiunte alle colture concentrazioni crescenti di 1B, 6G e pirimetamina (1,56-3,125-6,25-12,5-25-50 mg/l). Dopo 48 ore di incubazione sono stati eseguiti test: MTT e Western Blotting. I risultati preliminari indicano che il composto 1B non interferisce in alcun modo sulla crescita delle cellule sane o tumorali, mentre il derivato tioureico (6G) esercita un significativo stimolo sulla crescita delle cellule VERO (+ 60%), ma non sulle MCF-7. Il farmaco di riferimento pirimetamina stimola in modo dose dipendente la replicazione delle MCF-7. L'espressione delle proteine p53 e p21 immo modificata nelle colture di MCF-7 trattate con le due nuove molecole ne conferma l'assenza di tossicità. Questi risultati preliminari, associati alla conferma che le due molecole sono attive specialmente verso i ceppi di *Plasmodium* multiresistenti sono incoraggianti per il proseguimento dello studio di nuovi strumenti terapeutici caratterizzati anche da scarsa citotossicità.

P76. APPROCCIO SISTEMATICO PER LA VALUTAZIONE DEI CAMPIONI TOSSICOCINETICI NEGLI ANIMALI DI CONTROLLO

Costa L., Terron A., Dorigatti R., Raimondo S.
Safety Assessment Department GSK, Research Center, Verona

L'EMA, attraverso il "Committee for Medicinal Products for Human Use", ha recentemente pubblicato delle linee guida per l'analisi e la valutazione dei campioni tossicocinetici provenienti da animali di controllo inseriti negli studi regolatori. Lo scopo principale di detta linea guida è quello di indirizzare le industrie farmaceutiche cercando di identificare in quali condizioni si renda necessaria la valutazione dei controlli negli studi di tossicocinetica e come vadano relazionati e valutati i dati ottenuti e le loro potenziali conseguenze. Le "buone pratiche di laboratorio" della Food and Drug Administration non richiedono specificatamente che tali campioni vengano analizzati, tuttavia esistono delle linee guida scientifiche (ICH S3A). Risulta evidente che le linee guida correnti sono permissive, che è necessario differenziare gli eventi isolati o artefattuali dalle contaminazioni vere e proprie, chi è responsabile della identificazione, documentazione, valutazione e relazione dei dati di contaminazione e che è necessario identificare dei criteri per confermare l'avvenuta contaminazione. Questo lavoro si propone di valutare tali aspetti nel contesto della nostra esperienza e di presentare una serie di norme pratiche, considerate come standard, relative alla contaminazione dei campioni di controllo nelle valutazioni tossicocinetiche.

P77. MECCANISMO DELL'EFFETTO ANTINFIAMMATORIO DEI GLUCOCORTICOIDI: RELAZIONE CON LA VIA DEI LIGANDI DI PPAR- α

Crisafulli C., Mazzon E., Muià C., Caputi A.P., Cuzzocrea S.
*Dipartimento Clinico e Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Facoltà di Medicina,
Università degli Studi di Messina Torre Biologica, Policlinico Universitario, Messina*

I recettori per i glucocorticoidi (GR) e i PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) giocano un ruolo importante in condizioni sia fisiologiche che patologiche come la differenziazione cellulare, la lipolisi, il controllo del metabolismo del glucosio, l'immunità, e l'infiammazione. Infatti, studi recenti suggeriscono che i ligandi endogeni ed esogeni di PPAR-alpha, come i glucocorticoidi, potrebbero anche essere clinicamente benefici in diverse patologie infiammatorie, anche se il meccanismo molecolare responsabile di questa attività non è ancora stato chiarito. In questo studio, tramite l'utilizzo di un modello murino di infiammazione, pleurite indotta da carragenina, mostriamo che l'attività antinfiammatoria mostrata dal Dexamethasone (DEX) è revertita in assenza dei recettori per PPAR- α (utilizzando topi PPAR- α knock out). In più, l'assenza di un gene funzionale per PPAR- α nei topi PPAR- α KO abbassa significativamente l'abilità del DEX di ridurre: (i) il grado di danno polmonare, (ii) l'aumento dell'attività mieloperossidasi (MPO), (iii) l'aumento nella colorazione (immunoistochimica) per poly-ADP-ribose, TNF- α e IL-1 β causata dalla somministrazione di carragenina. In conclusione abbiamo chiaramente dimostrato che le proprietà antinfiammatorie del DEX inoltre sono collegate con l'interazione con i recettori per PPAR- α .

P78. VENLAFAXINA, INIBITORE DEL REUPTAKE DELLA SEROTONINA E NORADRENALINA (SNRI) ED EFFETTO SIMIL-AMFETAMINICO

Davanzo F.¹, Morganti C.³ Manfrè S.¹, Sesana F.¹, Zoppi F.²

¹Centro Antiveleeni di Milano; ²Laboratorio di Chimica Clinica e Tossicologia, Azienda Ospedaliera, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano; ³Laboratorio di Psichiatria, Azienda Ospedaliera, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Introduzione. L'intossicazione da farmaci rappresenta il 30,25% (n.15.820) delle intossicazioni (n. 52.295) per cui il Centro Antiveleeni di Milano è stato contattato durante il 2004 da tutto il territorio nazionale e i casi riferiti alla venlafaxina rappresentano l'1,71% (n.272). In seguito a una ingestione incongrua di venlafaxina in una donna di 35 anni si eseguì un'analisi delle urine sul REMEDi (sistema HPLC automatizzato) dal cui rapporto fu segnalata la presenza di para-metossiamfetamina. *Materiali e metodi.* Le analisi in cromatografia sia liquida (HPLC) con rilevazione in UV, sia gassosa con rilevazione in spettrometria di massa (GC-MS), mettono in evidenza nelle urine la presenza, rispettivamente, di due e di tre metaboliti della venlafaxina. In particolare l'analisi con la strumentazione HPLC dedicata REMEDi (Bio-Rad, Hercules – USA) può creare un equivoco nel riconoscimento di un metabolita, il cosiddetto metabolita 1, che viene segnalato come para-metossiamfetamina (PMA). La PMA appartiene al vasto gruppo delle droghe della classe amfetaminica, con effetti eccitativi e allucinogeni. Il metabolita 1 viene identificato in GC-MS come N-didemetil venlafaxina, un composto con una struttura che mima fortemente la struttura p-metossi feniletilamminica. Gli altri due metaboliti identificati in GC-MS sono la O-demetil venlafaxina e la N-demetil venlafaxina. Dei tre metaboliti individuati quello più interessante è senza dubbio la N-didemetil venlafaxina. Il fatto che il suo spettro UV sia sovrapponibile a quello della PMA, con la quale condivide il tempo di ritenzione nella corsa cromatografia, potrebbe essere suggestivo anche di una condivisione di effetto farmacologico che conferirebbe a tale metabolita un'azione amfetaminosimile. *Discussione e conclusione.* La venlafaxina è un antidepressivo biciclico. Sia la venlafaxina, sia il suo metabolita attivo (O-demetil venlafaxina) sono in grado di inibire la ricaptazione della serotonina, della noradrenalina e della dopamina. Considerando che il meccanismo d'azione della venlafaxina sembra essere in parte sovrapponibile a quello delle amfetamine, che inibiscono gli stessi recettori, i sintomi sia in dosaggio terapeutico sia in sovradosaggio, potrebbero essere spiegati. Si deve considerare che la venlafaxina presenta un meccanismo d'azione che la differenzia dal puro amfetaminico, dato che non è un bloccante delle MAO e non induce una liberazione di dopamina dalle vescicole sinaptiche. A supporto di questa ipotesi di metabolita amfetaminico si evidenziano i sintomi della sindrome da sospensione che ricordano da vicino la sospensione da dopaminoagonisti. L'identificazione di questo metabolita e gli effetti clinici sia in sovradosaggio che in regime di sospensione del farmaco, rende necessario, a nostro parere, eseguire ulteriori studi in merito.

P79. INTOSSICAZIONI DA FARMACI IN ETÀ PEDIATRICA: LA CASISTICA RILEVATA DAL CENTRO ANTIVELENI DI MILANO NEL 2004

Davanzo F.¹, Settimi L.² Manfrè S.¹, Bissoli M.¹, Ferruzzi M.¹, Sesana F.¹, Borghini R.¹, Travaglia A.¹, Dimasi V.¹, Giarratana T.¹, Vighi G.³

¹Centro Antiveleni, Azienda Ospedaliera, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano; ²Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Gruppo di Farmacovigilanza, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Introduzione. I farmaci rappresentano una delle principali cause di intossicazione prese in esame dai Centri Antiveleni (CAV). Dati USA mostrano che larga parte dei casi riferiti a questi agenti, è di natura accidentale e coinvolge soggetti con età inferiore a 6 anni. Importanti contributi per la valutazione della sicurezza di prodotti di ampia diffusione e per la conduzione di interventi per la prevenzione e normativi sono derivati da un'attenta e sistematica disamina dei casi di intossicazione da farmaci, con particolare riferimento a esposizioni in età pediatrica. Nonostante queste indicazioni, in Italia i dati sulle intossicazioni da farmaci in generale e sulle esposizioni in età pediatrica, in particolare, sono estremamente limitati e non ne permettono una adeguata caratterizzazione. Considerando questa carenza informativa, il presente contributo ha l'obiettivo di fornire una prima analisi descrittiva del fenomeno. *Materiali e metodi.* Il CAV di Milano è un Centro di riferimento nazionale, cui arrivano circa il 60% delle richieste di consulenza per intossicazione inoltrate annualmente ai CAV. Per ogni caso viene compilata una dettagliata scheda informatizzata. Da questo data base sono stati estratti e sottoposti ad analisi tutti i casi con età compresa tra 0 e 4 anni ed esposizione a farmaci verificatasi nel 2004. *Risultati.* Nel 2004, il CAV di Milano ha preso in esame 19.539 richieste di consulenza telefonica riferite a esposizione a farmaci (37% del totale delle consulenze). I casi clinici, con esposizione di tipo accidentale, sono stati 6.949, di cui 4.959 di età compresa tra 0 e 4 anni (71%). L'esposizione è avvenuta in ambito domestico (n=4.736, 95%) e la modalità di esposizione più frequentemente riportate, sono state l'assunzione di farmaci in modo non controllato (n=3704, 75%) e l'errore terapeutico (n=1102, 22%). Inoltre, sono stati rilevati 49 casi di reazione avversa in corso di terapia. Gli agenti più frequentemente associati agli incidenti in età pediatrica sono stati i FANS (n=1099), gli antibiotici di uso sistemico (n=424), anticoncezionali in pillole (n=365), il fluoruro di sodio (n=327) e le benzodiazepine (n=291). *Commenti.* La principale indicazione che deriva da questa analisi preliminare riguarda le categorie di farmaci su cui indirizzare l'attenzione, in via prioritaria, per una disamina delle modalità di confezionamento e una loro valutazione di efficacia per la prevenzione di esposizioni accidentali in età pediatrica. Le osservazioni effettuate possono essere considerate anche come una prima base informativa per l'avvio di approfondimenti di rilevanza clinica e terapeutica.

P80. IL MONITORAGGIO BIOLOGICO DELLA CICLOFOSFAMIDE URINARIA IN OPERATORI SANITARI PROFESSIONALMENTE ESPOSTI: UN'ESPERIENZA IN FRIULI VENEZIA-GIULIA

Franceschi L.¹, Baraldo M.¹, Gubian F.², Rosa I.³, Furlanut M.¹

¹Istituto di Farmacologia Clinica e Tossicologia, DPMSC, Università degli Studi di Udine;

²Direzione Sanitaria, Medico Competente, APUGD, Udine; ³Direzione Sanitaria, Medico Competente, AOSMM, Udine

Introduzione: L'esposizione a chemioterapici antitumorali (CA) rappresenta uno dei rischi professionali cui gli operatori sanitari risultano potenzialmente esposti. Sono stati sviluppati diversi metodi analitici per monitorare la potenziale esposizione degli operatori sanitari. Tra le sostanze impiegate come marker troviamo la Ciclofosfamide (CP), un agente alchilante impiegato nella terapia delle neoplasie e di malattie non-neoplastiche.

Obiettivo: Valutare, attraverso il monitoraggio biologico della CP, la eventuale esposizione del personale sanitario, prima e dopo la costituzione di un Sito Centralizzato per la Diluizione (SCD) dei CA.

Materiali e Metodi: il monitoraggio biologico della CP è stato eseguito su campioni urinari, prelevati all'inizio e alla fine del turno di lavoro, da infermieri professionali (IP) in servizio presso due Ospedali del Friuli Venezia-Giulia. Tale monitoraggio è stato condotto prima (gruppo A) e dopo (Gruppo B) la costituzione del SCD; il gruppo A era costituito da 23 IP provenienti da reparti di ematologia (7), medicina (9) e oncologia (7) (età media $35,8 \pm 5,4$ anni), che avevano maneggiato, in reparto, una quantità media di CP pari a 2105 ± 3099 mg/turno di lavoro. Il gruppo B era costituito da 18 IP afferenti all'UFA (età media $38,7 \pm 8,2$ anni) che avevano maneggiato una quantità media di CP di 5500 ± 2366 mg/turno di lavoro. L'analisi della CP è stata eseguita mediante tecnica di HPLC-MS/MS secondo la metodica, leggermente modificata, di Sottani et al. Come standard interno è stata impiegata la Ifosfamide (IF). Il limite di quantificazione era di 0,05 ng/mL. Il limite di rilevabilità (0,02 ng/mL) è stato utilizzato per definire la positività del campione.

Risultati: Nel gruppo A sono stati trovati 3 IP con presenza di CP nelle urine, di cui due positivi a fine turno di lavoro (0,033 e 0,048 ng/mL) e uno con una concentrazione di 0,075 e 0,158 ng/mL rispettivamente a inizio e fine turno. Nel gruppo B non sono stati rilevati campioni positivi per presenza di CP.

Conclusioni: Nella nostra esperienza, la costituzione di un SCD e una adeguata informazione e formazione è risultata fondamentale per eliminare il rischio di contaminazione da CA nel personale professionalmente esposto. Inoltre il monitoraggio biologico della CP si è confermato un valido strumento per verificare la bontà delle procedure previste per una corretta manipolazione dei CA e il loro rispetto da parte degli operatori.

P81. MECCANISMI DI FOTOTOSSICITÀ DEI FLUORO-CHINOLONI: III- DANNO SUL DNA CELLULARE E SUA RIPARAZIONE

La Sala G., Maggi A., Di Carlo B., Proietti Pannunzi C., Sapora O.
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La fotosensibilizzazione, prodotta dall'interazione tra luce e farmaci impiegati in trattamenti terapeutici, è un fenomeno ben noto. Infatti molte classi di farmaci reagendo con i fotoni caratteristici della luce nel campo dell'UVA e UVB, danno origine a fotoprodotto stabili o più frequentemente a radicali a vita breve, che reagendo con le strutture cellulari ne possono alterare struttura e funzioni. Una classe di farmaci, di particolare importanza per la sua applicazione, è quella dei fluorochinoloni, agenti anti-microbici con uno spettro di azione particolarmente ampio, che possiedono un nucleo cromoforo comune, con uno o due fluoruri, ma catene laterali differenti, che ne modulano le caratteristiche chimico-fisiche e l'azione. Nel presente lavoro sono riportati i risultati ottenuti studiando i meccanismi di azione di due fluorochinoloni (FQ), la Ofloxacin (OFLX) e la Lomefloxacin (LFLX), su due linee cellulari umane, le HL60 e le K562. Sono stati misurati due tipi di danno, le singole (ssb) e le doppie (dsb) rotture sul DNA cellulare mediante la tecnica del *Comet Assay*. Le cellule sono state trattate con due protocolli sperimentali: 1) esposizione acuta, FQ aggiunto immediatamente prima del trattamento con UVA, e 2) esposizione protratta, incubazione di due ore con FQ, rimozione del farmaco e trattamento radiante. I risultati ottenuti mostrano che: (a) la fotosensibilizzazione si ottiene a dosi terapeutiche, è funzione della concentrazione del FQ e della dose di UV ed è presente anche in cellule con esposizione protratta, (b) i FQ's in combinazione con gli UV producono radicali OH, (c) come danno iniziale sul DNA sono prodotte ssb, ma solo quando il FQ è presente al momento del trattamento radiante e tale danno viene rapidamente riparato, (d) le dsb non vengono prodotte come danno iniziale ma vi sono evidenze che si accumulino durante la riparazione del danno sul DNA, (e) cellule indotte al differenziamento presentano un minore numero iniziale di ssb a parità di trattamento. I presenti risultati, insieme a quelli già pubblicati, indicano che i FQ's possono agire secondo due differenti meccanismi i cui target principali sono rispettivamente le membrane e il DNA cellulare e che lo stato fisiologico della cellula ha particolare importanza nella produzione del danno iniziale.

P82. PROFILO COMPORTAMENTALE DELLA SALVINORINA A

Limonta V.², Braida D.², Malabarba L.², Pegorini S.², Zani A.², Guerini-Rocco C.¹, Gori E.¹, Sala M.^{1,2}

¹Centro di Farmacologia Comportamentale e delle Tossicodipendenze, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Milano

È di crescente diffusione tra i giovani l'utilizzo delle foglie di *Salvia Divinorum* per le sue capacità di indurre potenti stati allucinatori qualora ne venga preparato un infuso e ne siano inalati i vapori. Nonostante le foglie di *Salvia Divinorum* vengano utilizzate da secoli dagli Indios Mazatechi nelle cerimonie religiose per stabilire un contatto con le divinità, solo recentemente (Roth et al., 2002) è stato scoperto il suo principio attivo, la Salvinorina A che mostra un'alta affinità per il recettore κ oppioide. Scopo del presente lavoro è stato quello di studiare un profilo comportamentale della Salvinorina A sia nel ratto che nello zebrafish. A tale scopo sono stati indagati, dopo trattamento acuto di salvinorina A (0,05-160 microgrammi/kg) nel ratto Wistar, i seguenti effetti: 1) motori, attraverso la conta del numero di movimenti orizzontali e verticali in un'*activity cage* per la durata di 30 minuti; 2) rinforzanti, mediante il test della *Conditioned Place Preference* (CPP), consistente nell'associare la Salvinorina A e il veicolo a giorni alterni per la durata di 8 giorni in due ambienti diversi e nel misurare il tempo speso (sec) dall'animale in entrambi i compartimenti; 3) emozionali, mediante il test dell'*elevated plus-maze*, in grado di valutare effetti ansiolitici/ansioigeni sulla base del tempo speso o del numero di entrate nei bracci aperti/chiusi per 5 minuti. I risultati ottenuti indicano che la Salvinorina A: 1) non ha alterato l'attività motoria spontanea; 2) ha indotto un effetto sia rinforzante (0,1 e 40 microgrammi/kg) che aversivo (160 microgrammi/kg); 3) possiede proprietà ansiolitiche in un range di dosi tra 0,1 e 160 microgrammi/kg. Per quanto concerne gli studi sullo zebrafish (*Danio Rerio*), è stato valutato il comportamento natatorio secondo una scala di punteggi, come suggerito da Abramson ed Evans, applicato al pesce combattente (*Betta splendens*) trattato con LSD al fine di metterne in luce eventuali proprietà allucinatorie. Si dimostra così che la Salvinorina A (0,1-6400 microgrammi/kg), somministrata per via i.m., ha indotto un effetto bifasico caratterizzato da un nuoto accelerato o frenetico secondo un asse verticale, alle dosi più basse testate (0,1-0,2 microgrammi/kg), e un progressivo rallentamento alle dosi più alte, fino al raggiungimento di uno stato di *trance* (6400 microgrammi/kg). L'effetto bifasico è stato osservato anche nei pesci trattati con LSD (0,32-3200 microgrammi/kg). Studi preliminari effettuati per indagare il meccanismo d'azione indicano il coinvolgimento del sistema oppioide e cannabinoide negli effetti comportamentali della Salvinorina A in ambedue le specie animali.

Il presente studio è stato effettuato grazie al contributo della Regione Lombardia, Direzione Generale Famiglia e Solidarietà Sociale, nell'ambito del Progetto MDMA: monitoraggio sostanze e manifestazioni di abuso-implementazione di un sistema di allerta rapida sulla comparsa di nuove sostanze stupefacenti.

P83. EFFETTI NEUROTOSSICI NELL'AVVELENAMENTO DA MORSO DI VIPERA

Lonati D., Giampreti A., Petrolini V., Butera R., Locatelli C., Manzo L.
Servizio di Tossicologia, Centro Antiveneni di Pavia, Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, IRCCS, Fondazione Maugeri e Università degli Studi di Pavia

Gli effetti sistemici conseguenti all'avvelenamento da morso di vipera comprendono usualmente manifestazioni gastroenteriche, cardiovascolari e alterazioni della coagulazione. Negli ultimi anni sono stati osservati con crescente frequenza, specie in Italia e nella zona sud-orientale della Francia, casi caratterizzati da effetti neurotossici prevalentemente a carico dei nervi cranici, talora con esiti permanenti. *Obiettivo.* Descrivere gli effetti neurotossici conseguenti ad avvelenamento da morso di vipera. *Materiali e metodi.* Tra tutti i pazienti con avvelenamento da morso di vipera osservati nel periodo gennaio 2001 - dicembre 2002, sono stati identificati i casi con manifestazioni neurologiche. Di queste sono state valutate le caratteristiche, la gravità, la relazione con altri segni o sintomi sistemici e l'evoluzione. *Risultati.* Sono stati individuati 6 pazienti adulti di età compresa tra 30 e 75 anni che hanno sviluppato effetti neurotossici in seguito ad avvelenamento da morso di vipera. La sede del morso è stata in 4 casi l'arto inferiore e in 2 casi l'arto superiore. L'avvelenamento è stato in tutti i casi di gravità moderata. Gli effetti neurotossici sono comparsi dopo 4 - 30 ore, mentre gli altri effetti sistemici qualora presenti si sono manifestati dopo 40 minuti - 17 ore dal morso. In due casi la sintomatologia neurologica è stata l'unica manifestazione sistemica. I segni e sintomi neurotossici sono stati (i) ptosi palpebrale bilaterale in tre pazienti, (ii) ptosi palpebrale monolaterale sinistra in un paziente, (iii) diplopia isolata in due casi, e (iv) diplopia associata a disfagia e a deficit bilaterale dei muscoli masseteri in un caso. L'evoluzione temporale degli effetti neurotossici è risultata valutabile in 4 casi. In due pazienti tali effetti si sono risolti spontaneamente dopo circa 60 ore dall'insorgenza; negli altri due casi, trattati con frammenti anticorpali, si è osservata risoluzione completa in 24 ore. *Discussione.* Si stima che in Italia l'incidenza dei sintomi neurotossici nei pazienti con avvelenamento da morso di vipera sia dello 0,7%. Gli effetti sono dovuti a una specifica neurotossina, per la quale è stata documentata la possibilità di legame da parte dei frammenti anticorpali antiofidici. Le manifestazioni neurotossiche, usualmente in seguito a morso di *Vipera aspis*, comprendono disfonia, dispnea, disfagia, disturbi di accomodazione, oftalmoplegia, ptosi palpebrale bilaterale, paralisi del facciale bilaterale simmetrica, deficit dei muscoli masticatori, sternocleidomastoidei e nucali, e sono state finora osservate unitamente ad altri effetti sistemici moderati o gravi. A differenza di quanto osservato in letteratura, la casistica esaminata evidenzia la possibilità che gli effetti neurotossici insorgano anche in pazienti con sola sintomatologia locale. L'insorgenza ritardata delle manifestazioni neurologiche suggerisce l'opportunità di una valutazione attenta anche dei pazienti con segni minori di avvelenamento.

P84. FTALOCIANINA TETRASULFONATO: UN FARMACO ANTI-TSE

Lu M., Cradone F., Bonano M., Bellizzi N., Pocchiari M.

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) o malattie da prioni sono malattie neurodegenerative fatali che colpiscono sia l'uomo (malattia di Creutzfeldt-Jakob, MCJ, sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker, e insonnia fatale familiare) che gli animali (scrapie nella pecora e capra ed encefalopatia spongiforme del bovino, BSE). La patogenesi molecolare delle TSE è legata alla alterazione patologica di una proteina cellulare (la proteina prionica, PrP^c) che assume una conformazione ricca di foglietti beta (PrP^{TSE}) e polimerizza sotto forma di fibrille amiloidee che si depositano in maggior quantità a livello sistema nervoso centrale. La conversione patologica della PrP ha un'importanza primaria per la progressione della malattia, e rappresenta un target farmacologicoprimary per lo sviluppo dei farmaci anti-TSE. La Ftalocianina tetrasulfonato (FcTS) appartiene un gruppo di molecole (tetrapirroli) che è in grado di inibire la produzione del PrP^{TSE} *in vitro*, e rallentare la comparsa dei sintomi nei topi transgenici infettati con un ceppo di TSE (scrapie 263K) adattato al criceto. Il nostro studio è volto a verificare se il farmaco è efficace anche in altri modelli, e se la sua efficacia terapeutica è specifica per il ceppo infettante o per la specie ospite. La terapia con FcTS è stata condotta mediante somministrazione intraperitoneale del farmaco (5 mg/kg o 10 mg/kg, 3 giorni/settimana per 4 settimane) ad animali (topi C57BL o criceti) infettati con i ceppi di scrapie 139A e 263K o con i ceppi di TSE umana KFu e vCJD adattati ai topi. I risultati dimostrano che il farmaco svolge una efficace azione di allungamento del periodo di incubazione, che risulta avere un incremento compreso tra il 10 e il 31%. L'osservazione che l'azione farmacologica nel topo C57BL è molto differente a seconda dei ceppi utilizzati suggerisce che la FcTS svolga un'attività che è dipendente non tanto dal genoma ospite, quanto piuttosto dalle caratteristiche che emergono dalla interazione tra ospite e ceppo infettante. La stessa osservazione è valida se si paragonano i dati ottenuti da noi con il ceppo 263K nei criceti, con i dati precedenti sul medesimo ceppo in topi transgenici. Nonostante la variabilità dimostrata, i risultati ottenuti con i ceppi di scrapie e di EST umana sono estremamente positivi poiché dimostrano che la FcTS agisce su meccanismi patogenetici comuni che possono essere manipolati farmacologicamente.

P85. SCREENING MECCANICISTICI *IN VITRO* PER RIDURRE L'ATTRITO NELLO SVILUPPO DEL FARMACO

Magistrelli M., Pennella G., Venturi M.

Investigative Sciences Division Attrition Reducing Technologies, Nerviano Medical Sciences S.r.l., Nerviano

Lo sviluppo di un farmaco è un processo lungo, difficoltoso e costoso, durante il quale l'industria farmaceutica deve poter dirimere i propri sforzi, indirizzandosi verso molecole farmacologicamente attive e prive di tossicità importanti nell'uomo. A tale fine, si illustra la messa a punto di una strategia di screening e selezione *in vitro* di composti, basata su un approccio a passaggi multipli. I composti vengono inizialmente testati su fibroblasti umani cresciuti a confluenza (NHDF) per la rimozione delle classi chimiche che presentino tossicità non collegate al meccanismo d'azione della molecola o del bersaglio farmacologico; successivamente, previa caratterizzazione *in vivo* ed *in silico* della tossicità organo-specifica dei composti collegabile ad un meccanismo d'azione plausibile, si mettono a punto sistemi cellulari *in vitro* predittivi, valutando gli appropriati *endpoints* funzionali e/o morfologici. In ultima analisi, i composti vengono (de)prioritizzati sulla base degli effetti tossici misurabili quantitativamente sulle colture medesime ed eventualmente specie-specifici. L'identificazione del meccanismo d'azione della tossicità di composti in sviluppo farmaceutico permette quindi un'adeguato indirizzamento nell'espansione delle classi chimiche, nella determinazione della selettività dei composti e nell'interpretazione degli effetti tossici riscontrabili in specie animali differenti per una più appropriata valutazione del rischio.

P86. RILEVAZIONE DEGLI ERRORI TERAPEUTICI IN ETÀ PEDIATRICA: ESPERIENZA DEL CENTRO ANTIVELENI DI MILANO

Manfrè S.¹, Bissoli M.¹, Ferruzzi M.¹, Sesana F.¹, Borghini R.¹, Travaglia A.¹, Dimasi V.¹, Giarratana T.¹, Vighi G.³, Settimi L.², Davanzo F.¹

¹Centro Antiveleni, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano; ²Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Gruppo di Farmacovigilanza, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Introduzione: il Centro Antiveleni (CAV) di Milano, pur occupandosi prevalentemente di intossicazioni acute, costituisce un osservatorio privilegiato per altre problematiche in campo clinico farmacologico, quali a esempio l'errore terapeutico. Dalla discreta numerosità di alcune segnalazioni telefoniche possono scaturire segnali, a nostro avviso importanti, per sensibilizzare sia l'industria farmaceutica sia gli operatori sanitari (ospedalieri ed extraospedalieri) sugli scambi di preparazioni e sugli errori di dosaggi più frequenti che si verificano nella pratica clinica. Recentemente il CAV di Milano ha segnalato al Ministero della Salute e all'Assessorato alla Sanità della Regione Lombardia il problema crescente della ripetuta somministrazione incongrua di vitamina K1 ai neonati dopo la dimissione dai reparti di maternità, problema che sorge sia da incomprensioni tra il curante e la madre del neonato, sia dal frequente scambio, in farmacia, tra il VitaK prescritto dal pediatra e il Konakion (preparazione analoga, ma con concentrazione di vitamina K 1.000 volte superiore alla precedente).

Casistica e risultati: al Centro Antiveleni di Milano arrivano in media 60.000 richieste di consulenza telefonica all'anno e il 40%, circa, dei casi coinvolge bambini in età prescolare. Dal 1 Gennaio 2004 al 31 Marzo 2005 sono pervenute 165 segnalazioni riferite alla vitamina K, delle quali l'89,1% ascrivibili a casi clinici e il 6% a richiesta di informazioni. In ben il 53,75% dei casi vi è stato uno scambio tra le preparazioni VitaK e Konakion; nell'8,2% lo scambio è avvenuto con un altro farmaco; nel 32,6% si è verificato un errore nella posologia dovuto a semplice incomprensione. Il restante 5,4% delle consulenze si riferiva ad assunzioni autonome accidentali da parte di bambini.

Conclusioni: fortunatamente se con la vitamina K non abbiamo mai osservato problematiche a distanza dall'evento acuto, anche considerando i soggetti in cui il sovradosaggio si è protratto per mesi, la nostra preoccupazione riguarda la possibilità che analoghi scambi possano essere commessi, in un prossimo futuro, con l'immissione sul mercato di preparazioni analoghe contenenti principi attivi a basso indice terapeutico. Non è inoltre da sottovalutare l'impatto notevole sulla salute pubblica rivestito dalla possibile disattenzione del professionista, sia esso medico o farmacista.

P87. ESPOSIZIONE ORALE A CONTAMINANTI CHIMICI DA GIOCATTOLI: SISTEMI DI CARATTERIZZAZIONE, PREVENZIONE E RIDUZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO

Milana M.R., Giamberardini S., Gesumundo C., Padula G., Iori D., Panico O.
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il gioco è una delle attività fondamentali per lo sviluppo del bambino. I giocattoli devono essere “sicuri” e non presentare rischi per il bambino durante il loro impiego secondo l’uso prevedibile in considerazione del comportamento abituale dei bambini. I rischi potenziali presentati dai giocattoli sono di tipo fisico-meccanico (es. ingestione di piccole parti, infiammabilità etc) e chimico. (esposizione orale, inalatoria e cutanea a sostanze chimiche). Il rischio viene tenuto sotto controllo mediante verifiche di conformità dei giocattoli rispetto a parametri fisici, meccanici e chimici, per i quali esistono numerose norme tecniche internazionali. Il rischio chimico è legato alla presenza e al potenziale rilascio di sostanze chimiche dal giocattolo durante la sua manipolazione. Il rischio di esposizione orale a tali sostanze è legato alla possibilità che il giocattolo venga portato alla bocca. Nel caso di giocattoli destinati alla fascia di età 0-36 mesi, tale rischio è particolarmente consistente, in base alla consuetudine dei bambini di questa età di tenere in bocca, spesso per tempi prolungati o ripetutamente, qualsiasi giocattolo abbia forma e dimensioni tali da consentire ciò. Come misure generali di prevenzione, è importante che i materiali che compongono il giocattolo siano di elevata purezza ed esenti da sostanze migranti che possano risultare nocive per il bambino. In ogni caso per la valutazione del rischio chimico di un giocattolo, per esposizione orale, si effettuano test di migrazione su simulanti della saliva e si analizza il tipo e la quantità di migranti potenzialmente assumibili durante il “mouthing time” del giocattolo. Vengono quindi calcolati i livelli di intake potenziale del migrante in relazione al peso corporeo del bambino. Se tali livelli risultano tossicologicamente rilevanti, trattandosi di bambini potenzialmente esposti in modo ripetuto, viene generalmente applicato nelle diverse legislazioni internazionali il principio di precauzione e le sostanze migrabili sotto esame vengono limitate nel materiale o addirittura escluse dall’uso nella fabbricazione di giocattoli.

P88. ESPOSIZIONE A ESTERI FTALICI DA MATERIALI IN CONTATTO CON ALIMENTI: NUOVE VALUTAZIONI TOSSICOLOGICHE INTERNAZIONALI VS NUOVI SCENARI DI ESPOSIZIONE

Milana M.R., Feliciani R., Maggio A., Denaro M.

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'impiego massivo di esteri ftalici come plastificanti di polimeri ha inizio dagli anni '70. Le proprietà chimico-fisiche degli esteri ftalici risultano infatti particolarmente adatte per ottenere manufatti con prestazioni soddisfacenti. Specialmente il polivinilcloruro (PVC) viene spesso additivato con elevate quantità di ftalati (fino al 40-50%) per ottenere diversi gradi di flessibilità e prestazioni. Il settore dei materiali a contatto con alimenti (MCA) vede tra gli anni 70 e 80 un grande sviluppo di tali tecnologie. Assieme a tale sviluppo tecnologico si sono evidenziate però molte conoscenze su problematiche di tipo tossicologico sia a livello dell'uomo che dell'ambiente. Gli studi sviluppati nei decenni scorsi, parallelamente alle evoluzioni delle conoscenze e delle metodiche tossicologiche (es. proliferazione perossisomiale) hanno comunque rivelato che gli ftalati presentano effetti su sistemi biologici rilevanti per l'uomo. Al momento attuale è sotto forte dibattito l'importanza della attività di interferenti endocrini degli ftalati. Il potenziale di esposizione, attraverso l'ingestione di alimenti contaminati da ftalati migrati da materiali e oggetti in contatto è invece ben noto. Gli ftalati infatti, proprio per le loro caratteristiche chimico-fisiche (basso peso molecolare, mobilità, stabilità chimica etc) migrano facilmente dai manufatti che li contengono a un mezzo in contatto (es. alimenti, ambiente, saliva etc) creando il presupposto per l'esposizione dell'uomo e dell'ambiente a quantità significative di tali molecole. Il fenomeno della migrazione è accentuato in presenza di mezzi di contatto nei quali gli ftalati sono solubili (mezzi apolari, lipofili, alcolici). Da almeno un decennio sono pertanto in progressione sia in Italia che nella UE misure di prevenzione e riduzione del rischio che seguono l'evoluzione delle conoscenze tossicologiche. Ciò ha comportato una progressiva riduzione della esposizione a ftalati migrati da materiali ad alimenti.

P89. CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEL DOMINIO BH3 DELLA TRANSGLUTAMINASI TISSUTALE (TG2)

Mormone E.^{1,2}, Matarrese P.², Farrace M.G.¹, Malorni W.², Piacentini M.¹, Rodolfo C.¹
¹*Dipartimento di Biologia, Università degli Studi Tor Vergata, Roma;* ²*Dipartimento di Farmacologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La transglutaminasi tissutale (TG2) è un enzima ubiquitario il cui aumento caratterizza le cellule che vanno incontro a morte per apoptosi sia fisiologica sia patologica. L'over-espressione di TG2 in cellule neuronali (TGA) accelera i processi di morte cellulare attraverso la via mitocondriale. L'analisi morfologica di queste cellule ha mostrato come, anche in assenza di stimolo apoptotico, vi siano profonde variazioni nell'ultrastruttura dei mitocondri, maggiore densità elettronica della matrice e riarrangiamento delle creste, associate a cambiamenti funzionali, come: iperpolarizzazione costitutiva delle membrane, incremento della produzione di ROS e abbassamento dei livelli intracellulari di GSH. Al fine di verificare se la TG2 fosse direttamente responsabile delle variazioni osservate, abbiamo analizzato eventuali interazioni tra TG2 e proteine coinvolte nella regolazione della fisiologia mitocondriale (fattori di fissione e fusione) e/o della via mitocondriale dell'apoptosi (proteine della famiglia Bcl-2) e le possibili modificazioni indotte dalla over-espressione di TG2. La TG2 possiede una regione che presenta oltre il 70% di omologia col dominio BH3 di Bcl-2. La caratterizzazione dell'attività biologica di questo dominio, in linee cellulari che non esprimono livelli rilevabili di TG2 (SK-N-BE(2)), è stata effettuata mediante: i) trasfezione di vettori per l'over-espressione di mutanti del dominio, and ii) utilizzo di peptidi che presentano la medesima sequenza aminoacidica del dominio in questione. L'over-espressione di mutanti puntiformi o di delezione inibisce completamente la sensibilizzazione all'induzione dell'apoptosi, come osservato nelle cellule TGA. Il trattamento della linea SK-N-BE(2) con il peptide BH3-TG2 ha evidenziato come questo sia in grado di indurre morte cellulare per apoptosi, con un andamento paragonabile a quello osservato nella linea TGA trattata con STS, caratterizzata da rapida depolarizzazione dei mitocondri e rilascio di citocromo c. Inoltre, il peptide induce il cambiamento conformazionale di Bax e la sua traslocazione sui mitocondri. Il trattamento con il peptide BH3-TG2 di mitocondri isolati induce depolarizzazione e rilascio di citocromo c. Il pretrattamento con l'inibitore della permeabilità di membrana mitocondriale, CsA, inibisce questi eventi sia in cellule intere sia in mitocondri isolati. Il peptide BH3-TG2 è in grado di co-precipitare Bax e anche la TG2 interagisce con Bak e Bax e l'interazione con Bax aumenta dopo induzione dell'apoptosi. Inoltre, i nostri dati dimostrano che Bax costituisce un substrato specifico per TG2 la cui attività enzimatica determina la formazione di polimeri di Bax ad alto peso molecolare. Questi dati mostrano che l'over-espressione di TG2 favorisce la localizzazione mitocondriale di Bax che potrebbe essere alla base della maggiore suscettibilità agli stimoli apoptotici.

P90. ASPETTI TOSSICOLOGICI DEI PRODOTTI A BASE DI PIANTE MEDICINALI: L'ESPERIENZA DEL CENTRO ANTIVELENI DI MILANO

Moro P.A.¹, Assisi F.¹, Davanzo F.¹, Menniti Ippolito F.², Chiesara E.³

¹*Centro Antiveleeni, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano;* ²*Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma;* ³*Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica Emilio Trabucchi, Università degli Studi di Milano*

Negli ultimi anni si è osservato un aumento dell'uso di prodotti di medicina non convenzionale nei Paesi occidentali, con introduzione sul mercato anche di preparati importati dai Paesi extraeuropei e di droghe vegetali non tradizionalmente usate in Europa. Da gennaio 2.000 a giugno 2005 il CAV di Milano ha ricevuto 1436 chiamate per esposizione a prodotti erboristici e omeopatici. Tra questi vi sono diversi casi di gravi reazioni avverse (rabdomiolisi da Guggul, svariati casi di epatite) e di intossicazioni acute dovute alla presenza di contaminanti naturali e di sintesi. La pronta identificazione di questi eventi da parte dei Centri Antiveleeni e la loro segnalazione agli organi competenti, anche attraverso il sistema di sorveglianza dell'ISS, permette di mettere in atto degli interventi urgenti a tutela della salute pubblica. È accaduto, infatti, che la segnalazione da parte del Cav di Milano di alcuni casi di intossicazione acuta abbia portato all'identificazione di una partita di *Coleus Forskolii* contaminata con alcaloidi tropanici, di prodotti ayurvedici contenenti alti livelli di piombo, di un prodotto per bambini contenente salicilati, di sostanze naturali allucinogene, vendute attraverso il canale delle erboristerie come la *Salvia divinorum*, successivamente inserita nella lista delle sostanze psicotrope, e la *Argyrea nervosa*, contenente acido lisergico. La regolamentazione di questi prodotti è carente, nonostante la loro azione, salutistica o terapeutica, sia rapportabile a quella dei farmaci convenzionali. A differenza dei farmaci, queste droghe vegetali hanno, però, un'azione più complessa, dovuta alla contemporanea presenza di più principi attivi, e meno prevedibile, essendo estremamente variabile la loro composizione nei singoli preparati presenti in commercio e la loro biodisponibilità. Non è disponibile una valida documentazione scientifica sull'azione farmacologica, l'efficacia clinica e la tossicità della maggior parte delle piante medicinali. Nonostante ciò, sono pubblicizzati come più sicuri dei farmaci perché "naturali" e consigliati soprattutto in quelle situazioni nelle quali maggiormente dovrebbero essere usati con cautela, come la gravidanza, l'età pediatrica e l'allattamento. L'uso concomitante con altri farmaci può causare delle interazioni, con alterazioni dei livelli terapeutici e possibili gravi effetti clinici. La valutazione tossicologica di molti di questi prodotti è estremamente difficile: i dati riportati in etichetta sono scarsi, gli standard qualitativi di produzione bassi, i controlli carenti e il rischio di contaminazione è alto, soprattutto per i preparati provenienti dall'estero. Per tutti questi motivi si ritiene necessario sensibilizzare la popolazione e la classe sanitaria sui possibili rischi legati al loro uso.

P91. IL TRATTAMENTO CON STREPTOZOTOCINA INDUCE ALTERAZIONI VASCOLARI DETERMINATE IN PARTE DALL'ATTIVAZIONE DEL "PATHWAY" DELLA CICLOOSSIGENASI-2

Nacci C., Tarquinio M., Potenza M.A., Montagnani M., Carratù M.R., Brigiani G.S.
Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Bari

La streptozotocina (STZ) è un agente alchilante, usato sperimentalmente per indurre il diabete di tipo I. La distruzione selettiva delle cellule β pancreatiche e la conseguente iperglicemia scatenano un processo infiammatorio caratterizzato dal rilascio di citochine e dalla neosintesi proteica. L'ossido nitrico (NO), iper-prodotto dalla forma inducibile della NO-sintetasi (iNOS), è uno dei mediatori pro-infiammatori che contribuiscono alla disfunzione vascolare indotta dall'iperglicemia. Alterazioni del metabolismo dei prostanoidei sono implicate nella patogenesi del diabete, sebbene il ruolo della cicloossigenasi (COX) sia ancora controverso. Scopo della ricerca è stato quello di investigare il pathway della COX-2 nelle modificazioni vascolari associate allo sviluppo del diabete di tipo I indotto da STZ. Il trattamento acuto con STZ (240 mg/kg, IP) o con tampone citrato è stato effettuato su topi Balb/c. La glicemia e il peso corporeo sono stati monitorati settimanalmente. Le arterie mesenteriche sono state isolate dopo 4 e 8 settimane dal trattamento con STZ sia dagli animali trattati che dai controlli. La vasodilatazione è stata valutata mediante mediatori endotelio-dipendenti (acetilcolina, ACh; 0,01-10 μ M) o endotelio indipendenti (sodio nitroprussiato; 0,01-1 μ M). La risposta ad agenti vasocostrittori quali la noradrenalina (NA; 0,01-100 μ M) e l'analogo del trombossano A_2 (U46619; 0,01-10 μ M) è stata studiata sia prima che dopo trattamento con l'inibitore della NOS, L-NAME (100 μ M) o quelli della COX, NS-398 (10 μ M) e indometacina (10 μ M). L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'ANOVA a due vie. L'espressione della COX-2 è stata valutata mediante esperimenti di western blotting (WB) su omogenati di arterie. Gli animali risultavano diabetici 72 ore dopo il trattamento con STZ con un aumento progressivo dell'iperglicemia e riduzione di peso corporeo. La reattività vascolare non presentava alterazioni significative nel primo stadio della malattia. Tuttavia, 8 settimane dopo il trattamento con STZ, si osservava una riduzione significativa sia del rilassamento indotto da ACh ($p < 0,05$ vs Ctrl, $n=10$), che della risposta contrattile alla NA e all'U46619 ($p < 0,01$ vs Ctrl, $n=15$). L'iporeattività ai vasocostrittori era completamente revertita dopo incubazione con L-NAME ($p < 0,01$ vs Ctrl, $n=7$) o con NS-398, l'inibitore selettivo della COX-2 ($p < 0,01$ vs Ctrl, $n=7$), ma non con l'indometacina. Gli esperimenti di WB evidenziavano l'espressione della COX-2 solo nei vasi dei topi trattati con STZ. In conclusione, il trattamento con STZ induce modificazioni vascolari caratterizzate da disfunzione endoteliale e ridotta vasocostrizione. Pertanto oltre all'NO, anche le prostaglandine vasodilatanti, rilasciate in seguito all'attivazione del pathway della COX-2, potrebbero essere responsabili della iporeattività vascolare osservata nel nostro modello sperimentale di diabete.

P92. DEIDROTARPLATINO: EFFETTI SUL CITOCROMO P450 (CYP) E SUGLI ENZIMI DELLO STRESS OSSIDATIVO IN FEGATO, RENI E TESTICOLI DI RATTO

Nannelli A.¹, Vaccaro E.¹, Marini S.², Trasciatti S.², Gervasi P.G.¹

¹*Istituto di Fisiologia Clinica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pisa;* ²*Abiogen Pharma, Pisa*

Il Deidrotarplatino (DTP) è un derivato del Cis-Platino (Cis-Pt), uno dei più potenti chemioterapici somministrati per il trattamento dei carcinomi di testicolo, ovaio e seno. Il trattamento con Cis-Pt, tuttavia, è complicato da numerosi effetti collaterali, tra cui nefrotossicità, sterilità, nausea; inoltre, determina una drastica variazione delle attività di isoforme di CYP sotto controllo ormonale e degli enzimi ad azione antiossidante. Il DTP è stato sintetizzato allo scopo di trovare un analogo del Cis-Pt che mantenga la stessa attività antitumorale ma sia maggiormente tollerato dall'organismo. L'obiettivo di questo lavoro è stato di verificare l'effetto del DTP sulle attività di alcune isoforme di CYP ed enzimi dello stress ossidativo in ratti maschi. I ratti sono stati trattati con una singola dose i.p. di DTP 25 mg/Kg e sacrificati dopo 3 o 7 giorni. Il fegato, i reni e i testicoli sono stati prelevati e utilizzati per la preparazione di microsomi e citosol. Il DTP non riduce il contenuto totale di CYP nel fegato ma ne determina un aumento nel rene, contrariamente al Cis-Pt. Il DTP non causa inibizione dell'attività progesterone-idrossilasi (CYP17 dipendente) a livello del testicolo, tuttavia determina una deplezione del contenuto plasmatico di testosterone, sebbene a livelli inferiori al Cis- Pt. Il trattamento con DTP dopo 3 giorni determina l'inibizione delle attività 2 α e 16 α testosterone-idrossilasi (CYP2C11 dipendenti), in concordanza con la riduzione dei livelli plasmatici di testosterone; tuttavia dopo 7 giorni queste attività ritornano ai valori di controllo. Il DTP non influenza le attività anilina-idrossilasi (CYP2E1 dipendente) e acido laurico idrossilasi (CYP4A dipendente) a livello epatico, mentre, contrariamente al Cis-Pt, le induce nel rene. Il DTP non determina nel fegato variazione del contenuto totale di glutazione ridotto, dei livelli di perossidazione lipidica e delle attività degli enzimi dello stress ossidativo (GSSG-Reduttasi, GSH-Perossidasi, Glutazione-S-Transferasi, Catalasi). Nel rene, contrariamente a una forte riduzione di questi enzimi osservata nei trattati con Cis-Pt, il DTP provoca solo una leggera induzione dell'attività GSH-Perossidasi. In questo studio abbiamo dimostrato che il DTP ha un effetto marginale sul sistema enzimatico epatico e renale di difesa dallo stress ossidativo e che, inoltre, causa una riduzione, inferiore rispetto al Cis-Pt, dei livelli plasmatici di testosterone e delle attività delle isoforme di CYP sotto controllo ormonale. Questo suggerisce che il DTP dovrebbe presentare effetti collaterali ridotti rispetto al Cis-Pt. Attualmente sono in corso studi sul Deidrocolato, un metabolita del DTP, per valutare il suo specifico contributo all'azione del DTP.

P93. LE INTOSSICAZIONI ACUTE DA PIANTE. ANALISI DI UN ANNO DI CASISTICA DI UN CENTRO ANTIVELENI

Petrolini V., Saltarelli E., Lonati D., Butera R., Locatelli C., Manzo L.
Centro Antiveleeni di Pavia, Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, Fondazione Salvatore Mangeri e Università degli Studi di Pavia

Introduzione. L'ingestione di piante tossiche o sospette tali costituisce un problema di frequente riscontro nei dipartimenti d'emergenza (DEA). La gestione di questi casi prevede il riconoscimento della pianta in causa, la conoscenza della sua tossicità intrinseca e l'impostazione di una corretta terapia nonché, se possibile, una diagnostica specifica. *Obiettivo:* valutare frequenza, caratteristiche e fattori di rischio correlati all'intossicazione sulla casistica di intossicazioni acute da piante del Centro Antiveleeni di Pavia (CAV).

Materiali e metodi: sono stati esaminati retrospettivamente i casi relativi a richieste di consulenza provenienti da DEA per intossicazioni acute (accertate/sospette) da piante nel periodo 01/06/2004-31/05/2005. Sono stati rilevati i dati relativi ai pazienti, alle piante coinvolte, alle modalità dell'evento e alla stima del rischio di intossicazione effettuata alla prima consulenza del CAV.

Risultati: sono stati studiati 197 casi, di cui 189 intossicazioni accidentali (94,94%) e 8 volontarie (4,23%). L'età media risulta 14,9 anni ($\pm 21,79$), con il 44,67% dei pazienti di età inferiore a tre anni. La pianta è stata identificata in 175 casi (in totale 80 piante diverse) e in 22 è rimasta non identificata. Si è trattato di piante selvatiche in 52 casi, coltivate in 67 e d'appartamento in 58. Alla prima consulenza del CAV, 86 eventi sono stati giudicati a basso rischio e 111 ad alto rischio. Di questi ultimi, 89 pazienti hanno ingerito una pianta sicuramente tossica e 22 una pianta non identificata. Tutti questi pazienti sono stati ricoverati e sottoposti a controlli ematochimici e, ove indicato, strumentali. Negli 86 pazienti classificati a basso rischio, invece, si è potuta verificare l'ingestione di piante non tossiche in 30 casi e di una quantità giudicata subtossica di piante tossiche in 56: questi ultimi sono stati comunque trattenuti per alcune ore in osservazione. La valutazione clinico-tossicologica di un rischio elevato di effetti tossici è risultato significativamente correlato all'età adulta ($p=0,0023$), al contatto con piante selvatiche e coltivate rispetto a quelle d'appartamento ($p<0,0001$) e all'origine non nota della pianta ($p=0,042$).

Conclusioni: le intossicazioni acute da piante sono un problema rilevante che coinvolge soprattutto l'età infantile. L'elevata pericolosità di molte piante induce a comportamento prudente e all'osservazione clinica in ambiente ospedaliero anche nei casi dubbi. L'approccio diagnostico è migliorabile attraverso l'integrazione di più competenze professionali (medico esperto tossicologo, esperto botanico ed esperto in analisi tossicologiche) al fine di consentire una più precisa e precoce classificazione del rischio clinico, e conseguentemente l'impostazione più rapida dell'idonea terapia e la riduzione, in molti casi, dei tempi di osservazione clinica.

P94. LIVELLI DEGLI ELEMENTI CHIMICI NEL FLUIDO CEREBROSPINALE DI PAZIENTI AFFETTI DA MORBO DI PARKINSON

Ruggieri F., Bocca B., Forte G., Pino A., Alimonti A.

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Un aspetto caratterizzante il morbo di Parkinson è la sua eziogenesi multifattoriale. Tra i cofattori coinvolti nel rischio di insorgenza della malattia, particolare attenzione è stata rivolta a sostanze quali i metalli. Al fine di incrementare le conoscenze su questi potenziali cofattori ed evidenziare un loro eventuale significato predittivo-diagnostico, è stata studiata l'alterazione di Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sr, V e Zn nel liquido cerebrospinale di 42 pazienti affetti da morbo di Parkinson (36 maschi e 6 femmine, età media di $64,9 \pm 10,8$ anni, con scala di gravità Hoehn-Yahr 1-3 e durata media della malattia di $4,8 \pm 3,8$ anni) e di 12 individui di controllo (7 maschi e 5 femmine, età media $63,8 \pm 13,7$ anni) selezionati nella stessa area geografica. Sono state esplorate le associazioni tra parametri clinici dei pazienti e contenuto dei metalli. Le concentrazioni di Co, Cr, Fe, Pb, Si e Sn sono risultate significativamente più basse nei pazienti. Per Cr e Pb è stato possibile individuare un valore soglia di separazione fra il gruppo parkinsoniano e il gruppo di controllo. Questi due elementi risultano essere anche inversamente correlati con la gravità della patologia.

P95. LEVOSIMENDAN E STRESS OSSIDATIVO

Sapone A.¹, Torretta M.², Valgimigli L.³, Canistro D.¹, Broccoli M.¹, Biagi G.L.¹, Cantelli Forti G.¹, Trespidi S.¹, Limido A.², Stefano G.², Verna E.², Caico I.², Ghiringhelli S.², Provasoli S.², Salerno-Uriarte J.A.², Paolini M.¹

¹Dipartimento di Farmacologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna;

²Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Università degli Studi dell'Insubria, Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese; ³Dipartimento di Chimica Organica A. Mangini, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Lo stato di stress ossidativo (OSS) è stato di recente proposto come marker diagnostico per patologie cardiovascolari. È noto come l'OS sia un mancato bilanciamento tra generazione di radicali liberi (o di specie reattive all'ossigeno e all'azoto) e disponibilità di antiossidanti (di natura enzimatica e non) in un sistema biologico o compartimento. L'OSS può essere influenzato da molteplici fattori tra cui: dieta, esercizio fisico, esposizione ambientale/occupazionale e stile di vita quali tabagismo e alcolismo. Sulla base dello studio di singole specie radicaliche, è stato osservato come un elevato OSS sia coinvolto nella genesi di placche aterosclerotiche, e disfunzioni endoteliali, creando un vero circolo vizioso. Nei nostri laboratori è stato di recente sviluppato un metodo per la determinazione dell'OSS direttamente su sangue periferico attraverso una metodica EPR basata sull'uso di una sonda radicalica (Radical-Probe-EPR). La sonda radicalica, bis(1-idrossi-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)decandioato di-cloridrato, reagisce istantaneamente e quantitativamente con i radicali centrati sull'ossigeno (inclusi il superossido e perossinitrito), generando un nitrossido sufficientemente stabile da poter essere misurato mediante spettroscopia EPR. Questa metodica minimizza le problematiche legate all'invasività, instabilità e specificità verso singole specie radicaliche riscontrate con i convenzionali "spin-trap". Il Levosimendan, è un nuovo farmaco inotropo-vasodilatatore, usato nello shock cardiogeno che non aumenta il consumo di ossigeno, ha lunga durata d'azione (metaboliti attivi) e una migliore tolleranza rispetto ad altri farmaci somministrati in simili condizioni cliniche (dobutamina). La terapia è iniziata in unità coronarica sotto monitoraggio medico e laboratoristico; nell'arco temporale di un anno solare nella nostra unità coronarica sono stati trattati 15 pazienti con questo farmaco. In questo studio sono stati reclutati 5 pazienti (4 maschi e 1 femmina), che, per la loro criticità clinica, necessitavano di trattamento. Il Levosimendan è stato somministrato in bolo alla dose di 12 microgrammi/Kg/10 minuti e successivamente, in infusione per 24 ore, 0,1 microgrammi/Kg/minuto. Dopo 1, 6 e 24 ore sono stati effettuati prelievi di sangue venoso immediatamente esposti con la sonda per la successiva indagine EPR durante monitoraggio emodinamico con linea arteriosa e catetere di Swan-Ganz in arteria polmonare. Il miglioramento riscontrato in questi pazienti in termini di riduzione dell'OSS andava da 30% a un 55% alla ventiquattresima ora, e parallelo miglioramento dell'emodinamica. Il guadagno, in termini di ripresa di funzionalità ventricolare sinistra e condizioni cliniche generali, era già visibile alla sesta ora, anche se maggiore alla ventiquattresima ora. Questi risultati preliminari suggeriscono come il Levosimendan migliori la prognosi clinica dei pazienti sottoposti a trattamento anche attraverso una riduzione dello stress ossidativo.

P96. CORRELAZIONI NEUROENDOCRINE DELL'USO DI SOSTANZE PSICOATTIVE: LIVELLI PLASMATICI DI CATECOLAMMINE E ACIDO OMOVANILLICO

Saracino M.A.¹, Mercolini L.¹, Musenga A.¹, Zaimovic A.², Leonardi C.³, Raggi M.A.¹
¹Laboratorio di Analisi Farmaco-Tossicologica, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna; ²Centro Studi Farmacotossicodipendenze, AUSL di Parma; ³Unità Operativa Centrale di Prevenzione e Cura di Tossicodipendenze e Alcolismo, ASL RM C, Roma

È attualmente in corso uno studio in collaborazione con i Servizi Tossicodipendenze allo scopo di evidenziare gli effetti neuroendocrini dell'uso cronico di alcune sostanze psicoattive (alcool, cocaina, eroina). Lo studio si propone di individuare le correlazioni tra fenomeni comportamentali (es. aggressività) o socio-epidemiologici (es. vulnerabilità all'uso di droghe) e indicatori dello stato neuroendocrino dell'organismo. Infatti, l'individuazione di correlazioni statisticamente valide tra stato neuroendocrino ed esito della terapia di disintossicazione permetterebbe di prendere misure atte ad aumentare l'efficacia dei trattamenti e a diminuire il numero di soggetti che escono dal programma di reinserimento nella società. Inoltre, queste conoscenze potrebbero anche permettere di individuare i soggetti "a rischio", maggiormente vulnerabili all'abuso di sostanze psicoattive, e quindi di impostare azioni sempre più mirate alla prevenzione e cura delle tossicodipendenze. Da recenti studi risulta che i livelli plasmatici di catecolammine (adrenalina, noradrenalina, dopamina) possono essere considerati importanti markers neuroendocrini, pertanto utili per stabilire correlazioni significative con le caratteristiche psicosociali degli individui. Inoltre, la dopamina e il suo principale metabolita acido omovanillico (HVA) sono coinvolti nei sistemi di gratificazione cerebrali che causano il *craving* (ricerca compulsiva dello stimolo che gratifica o che allevia lo stato di malessere generato dall'astinenza) caratteristico dello stato di dipendenza. Si è pertanto scelto di effettuare la determinazione plasmatica di questi composti in soggetti ex-tossicodipendenti, attualmente sottoposti a terapia di disintossicazione (psicoterapia, trattamento con metadone o buprenorfina, comunità terapeutica) e che non usano contestualmente sostanze stupefacenti. I campioni di plasma, dopo opportuno pretrattamento mediante procedura di estrazione in fase solida, vengono analizzati in cromatografia liquida (HPLC) accoppiata a rivelazione elettrochimica di tipo coulombometrico, che garantisce prestazioni ottimali in termini di sensibilità e selettività. Dai risultati finora ottenuti, sembra che i metodi analitici utilizzati consentano la determinazione riproducibile e accurata degli analiti, pur se presenti a bassissime concentrazioni (a livello di parti per trilione) e in una matrice altamente complessa come quella plasmatica. In un secondo momento, si prevede di ampliare la ricerca, sia studiando un numero maggiore di soggetti ex-tossicodipendenti, sia prendendo in considerazione differenti sostanze d'abuso (amfetamine, allucinogeni).

P97. NEUROPHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF NEWLY SYNTHESIZED DERIVATIVES OF NICOTINIC AND ISONICOTINIC ACIDS

Tantcheva L.¹, Petkov V.², Karamukova G.³, Abarova S.², Tsekova D.⁴, Escuder B.⁵, Miravet J.⁵

¹Laboratory of Drug Toxicology, Institute of Physiology, Bulgarian Academy of Sciences; ²Laboratory of Psychopharmacology, Institute of Physiology, Bulgarian Academy of Sciences; ³Faculty of Chemistry, University Snt. Kliment Ohridsky, Sofia; ⁴Faculty of Physics, University Snt. Kliment Ohridsky, Sofia; ⁵Department of Organic and Inorganic Chemistry, University of Castelon

Two newly synthesized peptides in the University of Castelon, Spain (Tsekova, Escuder and Miravet, 2004) are derivatives of L-Valine and structurally belong to the group of peptides-mimetics. The compounds are positional isomers, derivatives of nicotinic (M-6), and isonicotinic acid (P-6). Our aim was to study their pharmacological activity and toxicity as putative drugs and the drug interactions with some CNS- model compounds: - hexobarbital (HB) (50 mg/kg i.p.); - pentylentetrazole (PTZ). In present work we studied the effect of P6 and M6 in male albino mice ICR with initial body weight 18-20g (10 in groups). Significant analgesic effect of both substances (in dose 250 mg/kg i.p) was established, most pronounce on the 1-st hour for compound P-6, and on the 3-rd hour for compound M-6. Depressing effect on the orientation reactions in animals was registered. Neuromuscular coordination and locomotor activity of treated animals were not changed in comparison to the controls. Good dose-dependent effect on learning and memory of treated animals was established by both compounds. Compound M-6 has stronger effect than P-6. It was found low acute and lack of prolonged toxicity. No changes in the organs after dissection of animals after 5, 7 and 14 day. There were not observed irreversible toxic damages in animals, 14 day after treatment. The drug interactions: -With Hexobarbital: Compound P-6 prolonged several times HB narcosis on the 1-st h and was available even after 24 hours. - With Pentylentetrazol: Pentileneterazole threshold was increased significantly on the 1hour after treatment with P-6 and M-6, demonstrating the antiepileptic activity of the compounds. We registered significant neuropharmacological activity, accompanied by low toxicity, demonstrates the perspectivity of the compounds and motivates the new synthesis and future experimental studies. Both compounds are positional isomers with only difference in the substitute of pyridine ring. Obviously, this fact is very important for established variations in their pharmacological activity and probably in their kinetics, metabolism and excretion from the body.

P98. VALUTAZIONE RETROSPETTIVA DI 15 ANNI DI TRATTAMENTO DELLE INTOSSICAZIONI DA FUNGHI DEL GENERE AMANITA CON UN PROTOCOLLO BASATO SULLA PENICILLINA G

Vannacci A., Giannini L., Missanelli A., Fabrizi F., Mastroianni R., Mannaioni P.F., Masini E.

Unità Operativa di Tossicologia Medica e Medicina delle Farmacotossicodipendenze, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi di Firenze

Introduzione. Nel panorama delle intossicazioni da funghi, oltre il 90% dei casi mortali è determinato dall'assunzione di macromiceti contenenti anatoossine, in particolare appartenenti al genere Amanita. Tali intossicazioni si caratterizzano per una lunga incubazione con un periodo asintomatico di circa 8-14 h e seguito dalla comparsa di vomito e diarrea; dopo 36-48 h compare un danno epatico che può esitare in coma e morte. A oggi non è disponibile un antidoto specifico e negli anni sono stati proposti vari approcci terapeutici, tra i quali l'utilizzo di Penicillina G. *Metodologia.* Sono stati valutati retrospettivamente tutti i casi di micetismo acuto ricoverati presso l'Unità Operativa di Tossicologia Medica della Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi dal 1993 al 2002 allo scopo di valutare: i principali indicatori di danno d'organo dell'intossicazione acuta da funghi del genere Amanita, l'efficacia del protocollo terapeutico utilizzato, la prognosi *quoad vitam* della intossicazione e la evoluzione a distanza del danno epatico. Il protocollo terapeutico applicato era basato su: correzione degli squilibri idro-elettrolitici e acido/base, fluidoterapia (11 di liquidi ogni 10 kg di peso corporeo), correzione della deplezione di glicogeno con glucosio e insulina, carbone attivato in dosi frazionate (20-40 gr ogni 4h), diuresi forzata (mannitolo al 18%), desametasone (20-40 mg/die), vitamina K (40 mg e.v./die), glutazione ridotto (2,4 g e.v. 2 volte al giorno), Penicillina G sodica/potassica (250.000-500.000 U/Kg). *Risultati.* Sono stati valutati in totale 111 pazienti (54 F) di età compresa tra i 18 e i 94 anni (media \pm ds 50,8 \pm 1,7). L'esordio sintomatologico è stato in media dopo 12,6 \pm 0,5 ore dall'ingestione dei funghi con diarrea (91,9%) e/o vomito (83,8%). Il picco di transaminasemia è stato raggiunto in media dopo 60,9 \pm 3,7 ore per le ALT e dopo 62,3 \pm 3,1 per le AST; il picco minimo di attività protrombinica si è verificato in media dopo 61,6 \pm 3,0 ore. Sono stati registrati soltanto 2 casi mortali su 111 esaminati (1,8%), entrambi verificatesi in pazienti ricoverati dopo 36 h dall'ingestione dei funghi. Il *follow up* eseguito dopo 12-180 mesi (89,6 \pm 6,7) su 105 pazienti dei 109 sopravvissuti ha dimostrato la completa remissione di tutti gli indici di epatopatia. *Conclusioni.* Il protocollo terapeutico esaminato appare adeguato a prevenire la mortalità se attuato nelle prime 36 ore di intossicazione. I dati del *follow up* a distanza, eseguito in media 56 mesi dopo l'intossicazione acuta, dimostrano che una volta superata la fase acuta, l'epatite falloidinica non va incontro a cronicizzazione.

P99. CONSUMO DI ALCOL E MALATTIE CARDIOVASCOLARI: FATTORI DI SUSCETTIBILITÀ

Ticchi C.¹, Attilia M.L.¹, Prastaro A.¹, Toppo L.¹, Rotondi C.¹, Mancinelli R.², Bertazzoni G.³, Nocente R.³, Ceccanti M.¹

¹Dipartimento di Medicina Clinica, Centro di Epatopatie Alcoliche, Università degli Studi La Sapienza, Roma; ²Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Dipartimento di Medicina d'Urgenza, Università degli Studi La Sapienza, Roma

Introduzione. È stato dimostrato che nella popolazione generale la correlazione tra consumo di alcolici e malattie cardiovascolari (MCV) è rappresentata da una curva a U o a J. Pertanto il bere moderato dovrebbe avere un effetto protettivo nei confronti delle MCV: ciò è probabilmente vero per la maggior parte della popolazione generale ma non per tutti poiché l'effetto dell'alcol può essere modificato da fattori di natura genetica. Alcuni geni, come il polimorfismo S447X del gene che codifica per la lipoproteinlipasi e il polimorfismo ADH3 dell'enzima-alcol deidrogenasi svolgono un ruolo di protezione nei confronti del processo aterosclerotico, invece altri come il polimorfismo E4 dell'apolipoproteina E e il polimorfismo 174 per l'interleuchina-6 (IL-6) sembrano avere un effetto opposto, aumentando il rischio di MCV. *Pazienti e metodi.* 61 alcolisti cronici (diagnosi secondo il DSM IV), afferenti al day-hospital del Servizio di Alcologia, età 21-69, 69% maschi e 31% femmine, sono stati suddivisi in sottogruppi, secondo il pattern allelico, e sono stati determinati HDL-c, LDL-c, colesterolo totale, trigliceridi; inoltre sono stati valutati i markers dell'abuso alcolico e le analisi di routine e sono stati monitorati i valori della pressione arteriosa. Nel 21,6% dei pazienti era presente un'anamnesi positiva per MCV. Le comuni analisi di routine sono state effettuate mediante auto-analyzer. La valutazione della frequenza allelica dell'Apo E è stata effettuata mediante tipizzazione genotipica, con la metodica di Hixon, e fenotipica, mediante isofocalizzazione. *Risultati.* I valori medi sono: trigliceridi 207,9±95,1, LDL- colesterolo 134,4±46,5, colesterolo totale 230,0±95,1, HDL- colesterolo 61,9±2,2. Come previsto i valori dei markers dell'abuso alcolico sono aumentati. I soggetti eterozigoti con genotipo E 4/3 mostrano valori di HDL-colesterolo significativamente più bassi ($p < 0,002$) e valori di trigliceridi significativamente più alti ($p < 0,025$) rispetto ai soggetti con genotipo E 3/3. Per quanto riguarda invece il valore medio delle LDL-colesterolo e quello del colesterolo totale, sono entrambi maggiori nei soggetti con genotipo E 4/3 rispetto a quelli con genotipo E 3/3, tuttavia la differenza tra i due campioni non è significativa. *Conclusioni.* Nei soggetti portatori dell'allele $\epsilon 4$ il rischio di MCV risulta aumentato in ragione delle modificazioni del loro assetto lipidico indotte dal fattore genetico. Pertanto è lecito ipotizzare che anche nei bevitori moderati portatori dell'allele $\epsilon 4$ il rischio di MCV sia aumentato e quindi sembrerebbe opportuno suggerire loro una completa astinenza dalle bevande alcoliche.

P100. ANALISI DI FATTIBILITÀ DI UNA BANCA DATI SU EFFETTI EPATOTOSSICI DA FARMACI

Vari M.R., Meneguz A.

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

È ormai noto che circa 100.000 morti all'anno e circa il quindici per cento di tutti i ricoveri in ospedale siano causati da reazioni avverse a farmaci. Dato che i farmaci, raramente, causano tossicità acuta, gli effetti collaterali più tossici si manifestano, spesso, solo dopo la somministrazione cronica, alla dose stabilita, durante un periodo di settimane o mesi. Dall'11 Gennaio 1994, la Food and Drug Agency ha approvato 303 nuove sostanze, sette delle quali sono state ritirate dal mercato per motivi di sicurezza. Come visto con il Baycol/Lipobay (cerivastatina), ritirato dal mercato nel 2001 a causa di 52 morti attribuite a rabdomiolisi, se somministrato in associazione al Gemfibrozil, e con il Rezulin (troglitazone), ritirato dal mercato nel 2000 quando tre pazienti sono morti in seguito a patologie collegate all'epatotossicità, gli effetti collaterali tossici non erano stati osservati durante lo sviluppo e la sperimentazione clinica del farmaco ma solo dopo anni che il farmaco era sul mercato. Tutti questi farmaci erano stati sperimentati secondo le richieste regolatorie standard per lo sviluppo e la commercializzazione. Tra gli effetti collaterali tossici, l'epatotossicità è quella maggiormente indicata quale causa di ritiro dal mercato, in quanto il fegato è il primo organo che incontra e metabolizza il farmaco. Probabilmente, il più difficile da predire, a causa di un grande numero di geni che sono coinvolti, molti studi sono stati pubblicati descrivendo i fattori multipli che potrebbero incidere sull'epatotossicità. In generale, gli animali vengono trattati con alte dosi della sostanza per brevi periodi di tempo, mentre gli esseri umani sono esposti a basse dosi e in maniera non continua durante un lungo periodo di tempo. Esistono anche differenze genetiche intra- ed inter-specie che possono contribuire a risposte qualitative e quantitative diverse con lo stesso farmaco. Non ultimo il polimorfismo genetico contribuisce alle difficoltà di avere un modello preclinico completamente predittivo. L'obiettivo della Banca Dati proposta è cercare di creare un database in grado di raccogliere e descrivere dati relativi a farmaci noti per avere un effetto collaterale epatotossico. I dati raccolti e il grado di similarità tra i nuovi composti e quelli inclusi nel database, potrebbero essere usati per predire un possibile effetto epatotossico delle nuove sostanze.

P101. INTOSSICAZIONE DA FUNGHI O TOSSINFEZIONE DA SALMONELLA TIFI? UN CASO DI TOSSICITÀ LEGATA AD ACE-INIBITORE

Zavarit A., Faraoni L., Bacis G., Farina M.L.
Centro Antiveleni, Ospedali Riuniti Bergamo

Introduzione: l'utilizzo dell'Ace-inibitore è riservato principalmente al trattamento dell'ipertensione essenziale e della terapia dello scompenso cardiaco congestizio. Il meccanismo d'azione del farmaco consiste, nell'inibizione dell'enzima Ace, responsabile della conversione dell'Angiotensina I in Angiotensina II (potente vasocostrittore), determinando vasodilatazione. L'impiego di tali farmaci è controindicato nei pazienti con alterata funzionalità renale, sia acuta sia cronica. L'Ace-inibitore è noto infatti avere una tossicità renale diretta e può provocare I.R.A. *Case report:* paziente di 66 anni, affetto da trombocitopenia essenziale, mielofibrosi idiopatica, ipertensione arteriosa essenziale, amputazione terzo medio coscia sx per osteomieliti recidivanti, in terapia con danazolo, prednisone 25 mg, ramipril 5 mg, metoprololo 200 mg, lormetazepam e clotiapina. Due giorni prima del ricovero, il paziente ha consumato funghi non controllati con comparsa dopo circa 2 ore di sintomatologia gastro-enterica caratterizzata da un episodio di vomito e da diarrea persistente (12 scariche in due giorni); nelle ore successive rialzo febbrile (T°38,5). Giunto in Pronto Soccorso si riscontrano: febbre, grave disidratazione, ipotensione (90/60), anemia severa (hb 6.0 g/dl), insufficienza renale acuta (creatinina 5,1 mg/dl) ed epigastralgie. Praticata una trasfusione di sangue (2 sacche di G.R. conc.), emagel (500 mg) e soluzione fisiologica (500 ml). Perdurando la sintomatologia gastro-enterica (continue scariche diarroiche) e l'iperpiressia, vengono effettuate: l'aminotina urinaria (negativa), l'urinocoltura, la coprocoltura e l'emocoltura (positive per salmonella Tiphy di gruppo B) L'intossicazione da funghi del genere Cortinarius, possibile responsabile dell'I.R.A., è stata subito esclusa per via della breve incubazione. Nelle 12 ore successive si assiste a un ulteriore peggioramento della funzionalità renale, persiste l'anuria e i valori di creatinina che salgono a 5,8 mg/dl e poi a 6,5 mg/dl. Viene sospeso l'Ace-inibitore e si prosegue l'idratazione a 120 ml/h. Dopo circa 30 ore la diuresi riprende e la creatinina migliora, fino a normalizzarsi in sesta giornata. Il paziente, risolto l'insufficienza renale acuta, è stato quindi trasferito nel reparto di malattie infettive per proseguire le terapie del caso. *Conclusioni:* la grave disidratazione causata dalla tossinfezione da salmonella e probabilmente aggravata dall'ingestione di funghi non controllati ha potenziato il rischio di nefrotossicità dell'Ace-inibitore, scatenando verosimilmente l'I.R.A. Particolare attenzione deve essere sempre rivolta alla funzionalità renale quando ci si accinge a prescrivere tali farmaci o, viceversa, di fronte al paziente disidratato e ipoteso in terapia con questi sarebbe utile la loro preventiva sospensione.

INDICE DEGLI AUTORI

- Abarova S.; 280
Abate V.; 194
Abballe A.; 246
Abdel-Rahman S.Z.; 217
Acampora A.; 45
Acito S.; 226; 227
Ademollo N.; 65
Adriani W.; 54; 188
Affatato A.A.; 217; 223
Agostini D.; 114
Aiello G.; 192; 204
Akpan V.; 235
Alfieri R.; 206
Alimonti A.; 85; 277
Alivernini S.; 194
Alleva E.; 29; 102
Alonzo E.; 104
Amoroso S.; 71
Andreoli C.; 119; 123; 243
Andreotti C.; 223
Angelini S.; 44; 218
Antonilli L.; 52
Ascione A.; 96
Ascione B.; 215
Assisi F.; 273
Attilia M.L.; 120; 282
Aureli F.; 63
Aureli P.; 63
Avolio A.; 174
Baccini C.; 122
Bacis G.; 284
Bacis G.; 171; 219
Badiani A.; 52
Baggio G.; 258
Baldi M.L.; 220
Balduini W.; 30; 181
Ballabio C.; 203
Ballini A.; 40; 42
Bani D.; 124
Baraldo M.; 263
Baroni D.; 22
Bartesaghi S.; 69; 72
Bartoli D.; 104
Bartolucci G.B.; 38; 40; 42; 46
Bascherini S.; 105
Basilicata P.; 45
Bassi A.; 119; 123; 221; 243
Battistelli C.L.; 194
Battistelli M.; 114
Belisario M.A.; 240
Bellizzi N.; 267
Belloni V.; 32
Benigni R.; 77
Bennett R.; 64
Bergamo P.; 66
Berrino L.; 214
Bertazzoni G.; 282
Bertini Malgarini R.; 17
Biagi G.L.; 223; 278
Biggiogera M.; 179
Binetti R.; 105; 120
Birindelli S.; 101
Bissoli M.; 262; 269
Blandini F.; 227
Blasi M.; 186
Bloise E.; 240
Bocca B.; 85; 277
Boccuti S.; 115
Bolle P.; 136
Bonafini S.; 257
Bonano M.; 267
Bonato M.; 80
Bonfanti P.; 140
Boni L.; 199
Borghini R.; 262; 269
Borracci P.; 228
Boschi F.; 179
Bossa C.; 77
Bottini C.; 25
Braghiroli L.; 95
Braidà D.; 242; 265
Brambilla G.; 23; 254
Branchi I.; 29
Bravi G.; 114
Brevini T.A.L.; 138
Brightwell J.; 161

Brigiani G.S.; 274
 Brigotti M.; 206
 Broccoli M.; 223; 278
 Broglia L.; 104
 Brughera M.; 137
 Brunekreef B.; 86
 Brunetti M.M.; 81; 255
 Bruni B.M.; 210
 Bugamelli F.; 122; 173
 Bulukin E.; 180
 Buratti F.M.; 103; 222
 Burdino E.; 88
 Bussi S.; 16; 163
 Butera R.; 175; 256; 266; 276
 Buttari B.; 121
 Caderni G.; 25
 Caglieri A.; 213; 244
 Cagnardi P.; 79
 Caico I.; 278
 Caiola S.; 195
 Calà P.G.; 104
 Calamandrei G.; 31; 102; 208; 249
 Calapai G.; 132; 236
 Calcagnile A.; 186
 Calicchia M.C.; 10
 Campana A.; 233
 Campolongo P.; 13; 70
 Canistro D.; 223; 278
 Cantelli Forti G.; 44; 122; 217; 218; 224;
 234; 237; 238; 247; 278
 Cantiello M.; 79
 Cantoni O.; 111; 148; 232; 241; 251
 Capone F.; 102; 249
 Cappetta D.; 115
 Capuano A.; 174
 Capuano M.; 18; 115; 174; 214
 Caputi A.P.; 15; 132; 236; 260
 Caracoi S.; 230
 Caradonna F.; 123
 Carbone F.; 44; 218; 224
 Carbone P.; 106
 Cardone F.; 196; 197
 Carelli G.; 193
 Carere A.; 21
 Carletti M.; 79
 Carli S.; 79
 Carloni E.; 148
 Carloni S.; 181
 Carnevali S.; 244
 Carnicelli D.; 206
 Carratù M.R.; 228; 274
 Carrieri G.; 71
 Carrieri M.; 38; 40; 42; 46
 Caruso D.; 113
 Casale F.; 88
 Casartelli A.; 80; 257
 Casella M.; 194
 Caserta S.; 214
 Casolini P.; 33
 Cassano T.; 70
 Cassee F.R.; 86
 Castaldo P.; 71
 Castiglia L.; 45
 Castoldi A.F.; 225; 226; 227
 Catalani A.; 33; 253
 Catone T.; 183
 Ceccanti M.; 120; 121; 282
 Ceccatelli S.; 213
 Ceredi A.; 199
 Cerenzia P.; 246
 Cerioli N.; 89
 Cerioni L.; 111; 148
 Cervellati R.; 112
 Cesetti A.; 187
 Cherubini E.; 89
 Chiesara E.; 78; 273
 Chiodi V.; 253
 Chirulli V.; 184
 Chiusolo A.; 159
 Ciabini D.; 160
 Cianfriglia M.; 96
 Cicalese R.; 161
 Ciccocioppo R.; 53
 Cifani C.; 53
 Cilento I.; 106
 Cimino M.; 181
 Cinelli S.; 81
 Cinque C.; 253
 Cippitelli A.; 53
 Clementi E.; 147; 232
 Coccini T.; 225; 226; 227
 Colasanti T.; 121

Colombo A.; 140
 Colombo M.L.; 59
 Colombo P.; 137
 Colosio C.; 101
 Colucci M.; 205
 Coluccia A.; 228
 Comelli F.; 140
 Cometa M.F.; 13; 62
 Coni E.; 61; 63
 Conti M.; 122
 Coppi A.; 258
 Corbi G.; 115
 Corsini E.; 69; 72; 101
 Cortes U.; 14
 Costa B.; 140
 Costa E.; 202
 Costa G.; 223
 Costa L.; 259
 Costa L.G.; 143; 253
 Costa S.; 112
 Costantini D.; 185
 Cradone F.; 267
 Crebelli R.; 6; 195; 201; 216
 Crisafulli C.; 15; 260
 Cristofori P.; 159
 Crobe A.; 106
 Crosta A.; 204
 Crosta L.; 192; 204
 Cuomo V.; 56; 70; 228
 Curci G.; 37
 Curci R.; 114
 Curione A.; 192; 204
 Cuzzocrea S.; 14; 15; 129; 239; 260
 D'Amico R.; 192; 204
 D'Errico M.; 26; 186
 D'Ippolito C.; 85
 Dacasto M.; 79
 Dal Negro G.; 97
 Davanzo F.; 106; 167; 168; 176; 261;
 262; 269; 273
 De Angelis G.; 188
 De Angelis I.; 183
 De Angelis S.; 249
 De Felice M.; 149
 De Felip E.; 7; 246; 252
 De Lucia D.; 18
 De Luna R.; 66
 de Novellis V.; 116
 De Palma C.; 147
 De Rinaldis E.; 186
 De Simone M.L.; 73
 Decorti G.; 211
 Delise M.; 65
 Della Puppa T.; 168
 Della Seta D.; 32
 Della Seta M.; 10
 Dell'Omo G.; 185
 Delunardo F.; 121
 Denaro M.; 271
 Desogus G.F.; 229; 230
 Dessi-Fulgheri F.; 32
 Di Carlo B.; 187; 264
 Di Consiglio E.; 183; 188
 di Domenico A.; 60
 Di Felice A.; 246
 Di Giamberardino L.; 197
 Di Giannuario A.; 205
 Di Luca M.; 72
 Di Paola R.; 14; 15; 239
 Di Pasquale M.; 63
 di Porzio U.; 54
 Di Prospero Fanghella P.; 5
 Di Renzo F.; 135
 Di Renzo G.; 71; 221
 Di Virgilio A.; 208
 Dimasi V.; 168; 262; 269
 Ditta S.; 204
 Dogliotti E.; 26; 186
 Dolara P.; 25; 113; 235
 Doria D.; 37; 40; 42; 191
 Dorigatti R.; 259
 Dossena M.; 179
 Dragoni S.; 37; 64
 Economidou D.; 53
 Escuder B.; 280
 Esposito A.; 61
 Eusepi A.; 208
 Evandri M.G.; 136
 Fabbri A.; 190; 210
 Fabietti F.; 65
 Fabricio A.S.C.; 73
 Fabrizi F.; 124; 281

Fabrizi L.; 61; 63
 Fais S.; 93
 Falcieri E.; 114
 Falcone S.; 147
 Falzano L.; 190; 210
 Falzarano S.; 248
 Fanelli R.; 60
 Farabollini F.; 32
 Faraoni L.; 106; 171; 219; 284
 Fardella M.; 104
 Farina M.L.; 106; 171; 219; 284
 Farrace M.G.; 272
 Fattore E.; 60
 Fattori V.; 253
 Fava L.; 104
 Feliciani R.; 271
 Femia A.P.; 25
 Ferrante L.; 174
 Ferrara F.; 65
 Ferrara N.; 115
 Ferraro L.; 70
 Ferro A.; 252
 Ferronato A.; 104
 Ferruzzi M.; 262; 269
 Filippelli A.; 18; 115; 174
 Filippelli W.; 18
 Filippini P.; 190; 210
 Fimognari C.; 127; 234; 247
 Finocchiaro S.; 104
 Fiorentini C.; 190; 210
 Fiorio R.; 184
 Flemma F.; 123
 Flego M.; 96
 Folesani G.; 213
 Fornarelli L.; 105
 Forte G.; 85; 277
 Fortini P.; 26
 Fortuna S.; 62
 Foti T.; 191
 Fracasso M.E.; 37; 38; 40; 42; 191
 Franceschetti L.; 248
 Franceschetti P.; 37; 38; 40; 42; 191
 Franceschi L.; 263
 Franchi A.; 104
 Franchini I.; 244
 Fratta W.; 51
 Frigerio S.; 78
 Fuccio C.; 116; 214
 Fuggetta D.; 203
 Funari E.; 65; 104
 Furlanut M.; 263
 Gaetani S.; 56
 Galassi G.; 160
 Galli C.L.; 9; 69; 72; 101; 203
 Gallo M.; 174
 Gambardella L.; 149; 215; 250
 Gandolfi F.; 138
 Garau A.; 69
 Garbero C.; 24; 198; 207
 Gardoni F.; 72
 Garofalo T.; 250
 Gatti A.M.; 154
 Gebbia N.; 192; 204
 Gee J.; 64
 Gemma S.; 252
 Genovese G.; 45
 Genovese T.; 14; 15; 239
 Georgatos J.; 170
 Gervasi P.G.; 184; 275
 Gesumundo C.; 270
 Ghezzi P.; 69
 Ghiringhelli S.; 278
 Giacomi A.; 253
 Giamberardini S.; 270
 Giamboi Miraglia A.; 190
 Giammarioli A.M.; 149; 250
 Giampreti A.; 256; 266
 Giangaspero A.; 211
 Giannini L.; 124; 281
 Giarratana T.; 262; 269
 Gilardi E.; 249
 Gioacchini A.M.; 114
 Giordani L.; 246
 Giordano G.; 143
 Giovannelli L.; 113
 Giovannetti A.; 149
 Giuliani A.; 186; 201
 Giustino A.; 228
 Gobbi V.; 243
 Goldoni M.; 213; 244
 Gori E.; 242; 265
 Gori G.; 38

Gosmar M.; 24; 198; 207
 Greco D.; 54
 Grippi F.; 192; 204
 Grossi S.; 207
 Guadagni R.; 45
 Guandalini E.; 61
 Guarino M.; 188; 231
 Guastadisegni C.; 86
 Gubian F.; 263
 Guerini-Rocco C.; 242; 265
 Guerra M.C.; 112
 Guerrini F.; 199
 Guglielmotti A.; 233
 Guidarelli A.; 148; 232; 251
 Hemminki K.; 44; 218
 Hrelia P.; 44; 204; 218; 224; 234; 237;
 238; 247
 Hrelia S.; 224
 Huang S.; 235
 Iavicoli I.; 193
 Illiano M.; 174
 Imperatore F.; 18
 Ingelido A.M.; 246
 Ingelman-Sundberg M.; 1
 Intorre L.; 180
 Iori D.; 270
 Karamukova G.; 280
 Kavanagh T.J.; 143
 Koukopoulos A.; 173
 Kumar R.; 44; 218
 La Rocca C.; 194
 La Sala G.; 264
 Lagatta V.; 208
 Lambiase L.; 18
 Landolfi C.; 233
 Lanza C.; 167
 Lanzoni I.; 248
 Laviola G.; 54; 188
 Lazzari G.; 139
 Legator M.S.; 217
 Lenzi M.; 234
 Leo D.; 54
 Leonardi C.; 279
 Leone A.; 240
 Leone M.G.; 95
 Leoni C.; 103
 Leopardi P.; 195
 Lepore A.J.; 169
 Li J.H.; 14
 Li W.; 14
 Libri I.; 246
 Liguori G.; 18
 Limido A.; 278
 Limonta V.; 242; 265
 Lionetti G.; 243
 Liu Q.; 197
 Locatelli C.; 106; 170; 175; 256; 266;
 276
 Lodovici M.; 235
 Lonati D.; 175; 256; 266; 276
 Longo M.; 137
 Longo V.; 184
 Lorenzetti S.; 136
 Lorenzini P.; 62
 Lorenzon P.; 211
 Loria G.R.; 204
 Lovati M.R.; 130
 Lovreglio P.; 40; 42
 Lu M.; 196; 197; 267
 Lucchetti D.; 61; 63
 Lucisano A.; 66
 Luongo C.; 18
 Luongo D.; 66
 Luongo L.; 116
 Maccà I.; 38
 Maccari S.; 33
 Macri C.; 208
 Maffei F.; 44; 218; 224
 Maggi A.; 187; 264
 Maggio A.; 271
 Magi S.; 71
 Magistrelli M.; 268
 Maione S.; 116
 Maiozzi P.; 106
 Malabarba L.; 242; 265
 Malorni W.; 146; 149; 215; 250; 272
 Mancinelli R.; 120; 121; 282
 Mandrioli R.; 122; 173
 Manfrè S.; 168; 261; 262; 269
 Manfredi V.; 24; 198; 207
 Manganelli V.; 250
 Mangano G.; 233

Mannaioni P.F.; 124; 281
Manno M.; 38; 40; 42; 46
Mannucci C.; 132; 236
Mantovani A.; 136; 208; 249
Manzo L.; 175; 225; 226; 227; 256; 266;
276
Marabini L.; 78
Maranghi F.; 136; 208; 249
Marangon K.; 59
Marani L.; 199; 248
Marastoni L.; 225; 227
Marcello I.; 106
Marchesi A.; 224; 237
Marcon F.; 195; 201; 216
Marguglio V.; 123
Margutti P.; 121
Marini S.; 275
Marino S.; 248
Marinovich M.; 10; 69; 72; 101
Martelli A.; 23; 24; 172; 207; 254
Martinelli A.; 104
Martinelli C.; 114; 206
Martínez-López E.; 185
Martino A.; 123; 221
Marvasi L.; 61; 184
Mascini M.; 180
Masini E.; 124; 281
Masotto I.; 80; 257
Massa V.; 135
Massi M.; 53
Mastroianni R.; 281
Matarrese P.; 215; 272
Materozzi G.; 37
Matteucci P.; 253
Mattioli B.; 246
Mattioli F.; 172; 198; 207
Mazzeo F.; 174
Mazzoli C.; 121
Mazzoli E.; 216
Mazzon E.; 14; 15; 239; 260
Menegazzi M.; 239
Meneguz A.; 17; 62; 94; 95; 205; 222;
283
Mengozzi G.; 202
Menniti Ippolito F.; 273
Mercati F.; 123
Mercolini L.; 279
Meucci V.; 180; 202
Milana M.R.; 164; 270; 271
Milandri A.; 199
Minetti M.; 212
Minoia C.; 101
Minunni M.; 180
Miraglia N.; 45
Miravet J.; 280
Misasi R.; 250
Missanelli A.; 281
Moccia L.; 162
Molfino S.; 203
Montagnani M.; 274
Moracci G.; 208; 249
Morandi S.; 119
Morazzoni P.; 131
Morganti C.; 261
Morgese M. G.; 70
Morisetti A.; 16; 163
Mormone E.; 272
Moro P.A.; 273
Morrone F.; 238
Mosiello A.; 81
Muià C.; 14; 15; 239; 260
Mulinacci N.; 113
Murru C.; 229
Musenga A.; 279
Mutti A.; 213; 244
Nacci C.; 274
Nannelli A.; 275
Natoli A.; 188; 231
Navarra P.; 73
Nebbia C.; 79
Nencini P.; 52
Nerini T.; 219; 220
Nieddu G.; 88
Nigro P.; 240
Nocente R.; 282
Nunziata A.; 119; 221; 243
Oliva P.; 214
Oliveri F.; 192; 204
Olivieri A.; 249
Orrù M.A.; 104
Orsi F.; 87; 140
Ortona E.; 121

Ottini L.; 186
 Pace S.; 74
 Padula G.; 270
 Palli D.; 26; 113; 186; 201
 Palmery M.; 13; 62
 Palomba L.; 148; 241; 251
 Palombo F.; 186
 Panico O.; 270
 Paoletti L.; 210
 Paolini M.; 223; 278
 Papa P.; 219; 220
 Parisi L.; 62
 Pastoris O.; 179
 Pavan A.; 250
 Pegorini S.; 242; 265
 Pennella G.; 268
 Perbellini L.; 191
 Peri L.; 212
 Perlasca F.; 167
 Perrone-Capano C.; 54
 Perrotta C.; 147
 Petio C.; 173
 Petkov V.; 280
 Petrolini V.; 175; 256; 266; 276
 Petronini P.G.; 206
 Piacente S.; 240
 Piacentini M.; 144; 272
 Picciolo M.; 243
 Piccoli G.; 114
 Piccoli P.; 38; 46
 Piegari E.; 214
 Pieratti A.; 132
 Pierdominici M.; 149
 Pieretti S.; 205
 Pieri M.; 45
 Pietraforte D.; 212
 Pignataro A.; 170
 Pimpinella G.; 17
 Pino A.; 85; 277
 Pistocchi R.; 199
 Pitozzi V.; 113
 Pizza C.; 240
 Pocchiari M.; 196; 197; 267
 Poleggi A.; 196
 Poli D.; 213; 244
 Porpora M.G.; 246; 252
 Potenza M.A.; 274
 Pozzetti L.; 223
 Pozzi R.; 86
 Pozzoli G.; 73
 Prastaro A.; 282
 Prato N.; 87
 Pretti C.; 180
 Previati M.; 248
 Preziosi P.; 73
 Profumo E.; 121
 Proietti Pannunzi C.; 264
 Provasoli S.; 278
 Quaranta M.G.; 246
 Radice S.; 78
 Raggi M.A.; 122; 173; 279
 Raimondo S.; 160; 162; 259
 Randine G.; 226
 Rastelli G.; 258
 Razzuoli E.; 202
 Renna G.; 228
 Restani P.; 59; 203
 Ricceri L.; 102; 208
 Rigano R.; 121
 Rinaldi B.; 18; 115
 Riva A.; 131
 Robbiano L.; 22
 Rocchi L.; 219; 220
 Roda E.; 225; 227
 Rodolfo C.; 272
 Rodolico G.; 214
 Romeo A.; 231
 Romeo L.; 191
 Romeo M.; 120
 Rosa I.; 263
 Rossi F.; 18; 115; 116; 174; 214
 Rossi M.; 66
 Rossi T.; 258
 Rossino V.; 104
 Rotondi C.; 282
 Rotondo C.; 120
 Rovera F.; 167
 Rubbiani M.; 105
 Ruberto A.I.; 258
 Ruggieri F.; 277
 Russo A.; 106
 Russo M.; 221

Sala M.; 242; 265
 Salamon F.; 46
 Salerno-Uriarte J.A.; 278
 Saltarelli E.; 276
 Salvadori M.; 25
 Salvini S.; 113
 Samoggia P.; 212
 Sandstrom T.; 86
 Sannolo N.; 45
 Santagostino A.; 87; 140
 Sapeva C.; 26
 Sapone A.; 223; 278
 Sapora O.; 187; 264
 Saracino M. A.; 173; 279
 Sartori G.; 104
 Sbriccoli M.; 196
 Scaccianoce S.; 74
 Scapellato M.L.; 38
 Scardala S.; 104
 Schiavo M. R.; 192
 Sciandrello G.; 123
 Sciorati C.; 147; 232
 Sciuscio D.; 247
 Selvatici R.; 248
 Sesana F.; 261; 262; 269
 Sessa M.; 18
 Sestili P.; 114; 206
 Settimi L.; 106; 176; 262; 269
 Severgnini P.; 167
 Severino L.; 66
 Sgaragli G.; 64
 Shore R.; 185
 Silvestrini F.; 201
 Simonelli A.; 45
 Simonelli V.; 26
 Siniscalchi A.; 199; 248
 Siniscalchi E.; 201; 216
 Siniscalco D.; 116
 Sisti R.; 161
 Sodano L.; 176
 Soldani G.; 180; 202
 Soleo L.; 38; 40; 42
 Soranzo M.R.; 211
 Sorice M.; 250
 Sosa S.; 211
 Spagnolo P.A.; 120
 Speroni E.; 112
 Stammati A.; 212
 Stefano G.; 278
 Stocchi V.; 114
 Storace S.; 172
 Stradiotti A.; 223
 Straface E.; 215
 Strumia C.; 104
 Sumberaz A.; 207
 Suzuki H.; 239
 Tanganelli S.; 70
 Tantcheva L.; 280
 Tarazona J.V.; 155
 Tarozzi A.; 128; 224; 237; 238
 Tarquinio M.; 274
 Tassinari R.; 208; 249
 Tedesco M.; 132; 236
 Terron A.; 160; 162; 259
 Tessitore L.; 25
 Testai E.; 8; 103; 183; 188; 222; 252
 Testino G.; 207
 Ticchi C.; 282
 Tinari A.; 250
 Tirelli V.; 183
 Togna G. I.; 74
 Tolomeo M.; 192
 Tommasini I.; 148; 251
 Toppo L.; 282
 Torretta M.; 278
 Traina E.; 188
 Traina M.E.; 231
 Trasciatti S.; 275
 Travaglia A.; 167; 262; 269
 Travaglione S.; 190; 210
 Trespidi S.; 278
 Trezza V.; 13; 70
 Tringali G.; 73
 Tringali M.; 87
 Trucco N.; 24
 Tsekova D.; 280
 Tubaro A.; 211
 Tucci P.; 17
 Turco L.; 183; 212
 Turrini A.; 60
 Turrio Baldassarri L.; 194
 Ugazio G.; 88

Uliva C.; 124
Ulivi P.; 258
Urbani E.; 231
Utan A.; 112
Vaccaro E.; 275
Vagaggini D.; 89
Vairano M.; 73
Valanzano A.; 197
Valdoni L.; 161
Valgimigli L.; 278
Valli A.; 220
Valoti M.; 37; 64
Vandin L.; 80; 257
Vannacci A.; 281
Vari M.R.; 283
Vellucci L.; 176
Venerosi A.; 102; 249
Venturi M.; 156; 268
Verna E.; 278
Verri M.; 179
Vettori M.V.; 213; 244
Vichi S.; 252
Vighi G.; 262; 269
Villa P.; 69
Violante F. S.; 44
Viora M.; 246
Visioli F.; 113
Vitalone A.; 253
Vitelli M.R.; 214
Viti V.; 186
Viviani B.; 69; 72
Volpe M. T.; 62
Vona R.; 215
Wang Z.Q.; 14
Wright J.; 185
Xu W.; 14
Yasumoto T.; 211
Zaffini R.; 239
Zaimovic A.; 279
Zancan A.; 256
Zani A.; 242; 265
Zanoncelli S.; 137
Zavarit A.; 284
Zhang J.; 14
Zijno A.; 195; 216
Zoppi F.; 261
Zuena A.R.; 253

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, dicembre 2005 (n. 4) 12° Suppl.