

Anno Accademico 2012-2013



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA

" METODI ALTERNATIVI ALLA SPERIMENTAZIONE  
ANIMALE: SUCCESSI, PROBLEMATICHE E NUOVE  
TECNOLOGIE EMERGENTI "

*Laureanda:*

Valentina Maria Marchica

*Relatore:*

Dott.ssa Marina Sciancalepore

*- pagina volutamente vuota -*

# Indice

Indice.....	I
Abbreviazioni.....	1
Abstract.....	2
Introduzione.....	3
Capitolo 1 Principio delle 3R: <i>replacement, reduction, refinement</i> .....	5
1.1 Rimpiazzare ( <i>Replacement</i> ).....	6
1.2 Ridurre ( <i>Reduction</i> ).....	6
1.3 Rifinire ( <i>Refinement</i> ).....	8
1.4 Interazioni tra le 3R.....	10
Capitolo 2 Nuova direttiva 2010/63/UE.....	12
2.2 Significato e conseguenze della Direttiva Europea 2010/63/UE per l'Italia.....	16
2.2.1 Contesto europeo e necessità di revisione.....	16
Capitolo 3 Iter procedurale per la validazione delle metodiche alternative.....	19
3.1 Intelligent Testing Strategies (ITS).....	24
3.2 Principali criticità del processo di validazione.....	25
Capitolo 4 Modello animale e ipotesi di predittività.....	26
4.1 Esempi di patologie umane per cui modelli animali sono da tempo riconosciuti fallimentari.....	29
4.2 Primati e sperimentazione animale.....	30
4.3 Modelli murini e sistema immunitario.....	32
4.4 Talidomide e test di teratogenesi su animali.....	33
Capitolo 5 Colture in vitro di cellule, tessuti, organi per ricerca, diagnosi e terapia.....	36
5.1 Colture cellulari <i>in vitro</i> .....	36
5.1.1 Colture Primarie.....	38
5.1.2 Colture continue.....	38
5.1.3 Linee cellulari.....	39
5.1.4 I terreni di coltura.....	39
5.1.5 Tipi di terreno e supplementi.....	40
5.1.6 Siero Fetale.....	41
5.1.7 I Supporti.....	42
5.1.8 Controllo della temperatura e della CO <sub>2</sub> .....	43

5.2 Vantaggi e limiti nell'uso delle colture cellulari.....	43
5.3 Nuove frontiere nei saggi cellulari: <i>strutture tissutali tridimensionali in vitro e sistemi microfluidici</i> .....	44
5.3.1 Studio su cellule del cancro alla mammella in un ambiente 3D .....	46
5.3.2 Saggi cellulari dinamici .....	47
Capitolo 6 Metodi sostitutivi .....	49
6.1 Metodi chimici .....	49
6.1.1 Corrosione cutanea Corrositex™ assay .....	49
6.1.2 Solatex-PI.....	51
6.2 Metodi biologici.....	51
6.2.1 Test di Ames .....	51
6.2.3 Microtox.....	52
6.2.4 Colture di epatociti.....	54
6.2.5 Lattato Deidrogenasi (LDH).....	55
6.2.6 Test di captazione del Rosso Neutro (NRU).....	55
6.2.7 Test di rilascio del Rosso Neutro (NRR) .....	56
6.2.8 Test di contenuto totale delle proteine (TPC).....	56
6.2.9 MTT Test: Test di riduzione dei sali di tetrazolio .....	56
6.3 Metodi matematico-informatici .....	57
Conclusioni .....	60
Bibliografia .....	62

## Abbreviazioni

**ECVAM:** European Centre for the Validation of Alternative Methods

**OECD:** Organisation for Economic Cooperation and Development

**UFAW:** University Federation of Animal Welfare

**REACH:** Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals

**ICCVAM:** Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

**SOP:** Standard Operating Procedure

**GLP:** Good Laboratory Practice

**NCI:** National Cancer Institute americano

**FAD:** Food and Drug Administration

**NRC:** National Research Council

**MHC-HLA:** sistema di istocompatibilità

**MTD:** massime dosi tollerate dall'adulto

**MEIC:** *Multi Evaluation of in vitro Cytotoxicity*

**BME:** Eagle's Basal Medium

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**RPMI:** 1640 Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium

**FCS:** Fetal Calf Serum

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**LDH:** Lattato Deidrogenasi

**NRU:** test di captazione del rosso neutro

**NRR:** test di rilascio del rosso neutro

**TPC:** test di contenuto totale delle proteine

**MTT:** test di riduzione dei sali di tetrazolio

**ITC:** inibizione del legame delle cellule tumorali

**QSAR:** Relazione Quantitativa fra Struttura e Attività

*- pagina volutamente vuota -*

## Abstract

I campi di utilizzo degli animali sono molteplici, la maggior parte viene impiegata per lo sviluppo di nuovi farmaci e apparecchiature, inoltre vengono impiegati per indagini legate alla ricerca di base, studi di tossicità, diagnosi di malattie, formazione universitaria, esperimenti bellici e test cosmetici.

La stragrande maggioranza degli esperimenti compiuti sugli animali sono quelli per i test di tossicità, obbligatori per legge, cioè quei test che dovrebbero accertare la pericolosità di una data sostanza chimica per l'uomo. Per quanto riguarda quelli compiuti nella ricerca biomedica di base, per lo studio delle malattie, non è obbligatorio per legge usare gli animali, però è quello che si continua a fare.

Già da alcuni decenni in molti campi di ricerca si sono diffusi, sia per esigenze scientifiche, sia per motivi etici, metodi complementari, alternativi ed innovativi, che mirano a ridurre l'uso di animali da esperimento e ad ottimizzare i risultati .

Alcuni di tali metodi sono stati validati da istituzioni che vigilano sull'efficacia e sull'affidabilità dei test.

Tutte le possibili alternative agli studi *in vivo*, dovrebbero essere prese in considerazione almeno al fine almeno di ridurre il numero degli animali impiegati.

Le Colture Cellulari, ad esempio, hanno rivelato una notevole utilità in studi scientifici in svariati settori della ricerca (tossicologia, microbiologia, genetica, oncologia, cosmetologia e molto altro).

I risultati ottenuti con le Colture Cellulari sono certamente “parziali”, ma attendibili, poiché l'uso delle cellule è specie-specifico.

Inoltre i metodi alternativi si sono rivelati efficaci laddove molti anni fa l'animale sembrava insostituibile (ad es. test di mutagenesi).

Una coltura o un tessuto di cellule umane, un modello matematico, uno studio epidemiologico o genetico su popolazioni umane, rappresentano pertanto un modello sperimentale di una parte o funzione dell'organismo umano. Ogni modello sperimentale presenta dei limiti intrinseci, in quanto per definizione è un qualcosa che approssima l'oggetto di studio, ma non è l'oggetto stesso. Anche i metodi sostitutivi alla sperimentazione animale presentano quindi dei limiti, tuttavia offrono l'indiscutibile vantaggio di essere sia eticamente che scientificamente sostenibili.

*- pagina volutamente vuota -*



## Introduzione

La sperimentazione animale è un fenomeno italiano e globale, che non accenna a diminuire; nonostante lo scenario scientifico nazionale ed europeo sia sempre più rivolto alla promozione di metodi sostitutivi all'impiego di animali, i numeri legati alla sperimentazione sono in aumento, arrivando ad una media annua di 911.962 animali in Italia (*Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 243*), 12 milioni di animali nei laboratori europei e 115 milioni nel mondo. Dati fortemente sottostimati in quanto non includono invertebrati, forme fetali e animali, o parti di essi, utilizzati una volta soppressi.

Le differenze inter-specifiche quali anatomia, struttura e funzione degli organi, metabolismo e vie di assorbimento, genetica, meccanismo di riparazione del DNA, comportamento e ciclo cellulare, condizioni di stabulazione ed effetti collaterali non diagnosticabili su animali, sono fattori cruciali che possono rendere i test preclinici fuorvianti e pericolosi nell'applicazione dei dati alla specie umana.

Per motivi etici ed economici molte organizzazioni internazionali, come ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) ed OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), lavorano da tempo per sviluppare normative che limitino sempre più l'utilizzo di animali in laboratorio, attraverso la convalida di test di tossicità *in vitro*.

Inoltre l'uso di metodi alternativi è stato incoraggiato dalla comunità scientifica sia per la maggiore attenzione rivolta al benessere animale, che per l'elevata qualità e accuratezza dei sistemi di saggio, spesso tradotta in una migliore capacità predittiva nei confronti della salute umana e dell'ambiente.

Esistono, e sono già in uso, molti metodi alternativi al modello animale, scientificamente maggiormente predittivi e affidabili grazie ad un lungo iter di validazione che li rende internazionalmente riconosciuti.

Negli ultimi vent'anni sono state sviluppate diverse metodologie alternative/complementari:

- Colture *in vitro* di cellule, tessuti, organi (per ricerca, diagnosi e terapia). L'utilizzo *in vitro* di linee cellulari che esprimono i principali enzimi umani deputati al metabolismo dei farmaci può aiutare a prevedere la formazione nell'uomo di nuovi metaboliti che gli studi sugli animali non riuscirebbero a identificare. I dati degli studi

*in vitro* possono essere presentati a corredo degli studi convenzionali di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione.

- Metodi in *silico*. Con questo nome si indicano, in generale, le metodologie implementate con applicazioni informatiche.
- Organi bioartificiali. Le membrane polimeriche semipermeabili, per le loro caratteristiche di separazione, immunoprotezione e di matrice artificiale, possono essere adoperate per la ricostruzione dei tessuti e organi *in vitro* e in processi di trattamento del sangue.
- Farmacogenomica. E' una branca della biologia molecolare che si occupa di indagare gli effetti di un determinato farmaco in base al genotipo dell'individuo.
- Metodi matematici.
- Epidemiologia e statistica, scienze di elezione per lo studio ed il riconoscimento di fenomeni (ad es. causa-effetto).
- Autopsie e biopsie.

# Capitolo 1

## Principio delle 3R: *replacement, reduction, refinement*

L'uso di animali presenta molti aspetti secondari, come le preoccupazioni etiche e l'eventuale rilevanza per la valutazione del rischio per gli esseri umani.

Nel 1959 Rex Burch e William Russell, membri della *University Federation of Animal Welfare* (UFAW), associazione tuttora molto attiva nel promuovere e diffondere la cultura del benessere animale, pubblicarono un libro intitolato "The principles of humane experimental technique". In questo libro i due autori introdussero una serie di raccomandazioni ai ricercatori volte a favorire una sperimentazione animale maggiormente attenta al benessere degli animali da laboratorio (Russell & Burch, 1959).

Questa serie di raccomandazioni, note come il "Principio delle 3R", fa riferimento a tre fondamentali concetti metodologici: rimpiazzare (*replacement*), ridurre (*reduction*) e rifinire (*refinement*).

Secondo la definizione di Russel e Burch, è considerata alternativa alla sperimentazione animale qualsiasi procedura (metodo o tecnica, proposta o approccio) volta a: 1) sostituirla un'altra che possa non nuocere l'interesse degli animali (*replacement* → sostituzione); quando ciò non sia possibile 2) ridurre il numero di animali richiesti (*reduction* → riduzione), o quando anche questo non sia possibile, 3) migliorarla in modo da ottimizzare il benessere animale durante la procedura stessa o nel suo contesto (*refinement* → perfezionamento).

Il replacement, inoltre, è ulteriormente distinto in assoluto (l'animale non viene usato in nessuna fase dell'esperimento) e relativo (l'animale viene usato per un certo scopo, per esempio, per prelevare un organo o tessuto per preparare la coltura primaria), ma umanamente sacrificato, per limitarne al massimo la sofferenza.

Questo metodo conosce oggi un'ampia diffusione ed è incorporato in linee guida e normative ma ha generato un ampio dibattito circa le metodologie scientifiche per la sua messa in pratica e il modo di intendere concettualmente e operativamente le tre R e le relazioni fra di esse. Oggi, ad esempio, sono validati e in via di diffusione metodi alternativi che soddisfano la R relativa alla sostituzione per indagare la tossicità di sostanze su colture cellulari *in vitro* anziché su animali.

## 1.1 Rimpiazzare (*Replacement*)

Questo concetto si riferisce alla possibilità di sostituire il modello animale con un modello alternativo. Nell'accezione originale del termine, Russell e Burch intendevano l'utilizzo di materiale non-senziente, al posto del modello animale. Infatti, i due autori descrivono una serie di metodi alternativi come, per esempio, piante, micro-organismi, sistemi chimici e fisici non viventi. Nel tempo questo concetto si è evoluto, assumendo diverse sfaccettature. In generale oggi si distingue un rimpiazzo parziale o relativo (*partial replacement*) e un rimpiazzo completo o assoluto (*absolute replacement*), concetti tra l'altro già suggeriti da Russell e Burch nel loro testo originale. Nel primo caso il modello animale originario viene sostituito da un modello che prevede l'utilizzo di una specie caratterizzata da una minore complessità del sistema nervoso, rispetto all'originale (un topo per una scimmia, un pesce per un topo, un invertebrato per un pesce, ecc.). In alternativa il modello animale viene sostituito da un modello non animale, in una certa fase del protocollo sperimentale.

Nel caso dell'*absolute replacement* invece, il modello animale è stato completamente eliminato dal protocollo sperimentale.

Il concetto di *replacement* ha a che fare con due tipi di domande: che cosa viene esattamente sostituito? Nel caso dovessimo proporre un'alternativa all'esperimento animale, quali sono le condizioni che devono essere rispettate? Potremmo voler ottenere dal metodo alternativo gli stessi risultati ottenuti in precedenza con il metodo tradizionale, per esempio come nel caso di un test utilizzato per dimostrare l'innocuità di un certo farmaco. Potremmo, oppure, ragionare in modo inverso, e modificare il fine o i risultati attesi, in modo da utilizzare meglio il metodo alternativo proposto. È necessario però porre l'accento sul fatto che le prime considerazioni sull'utilizzo o meno di una tecnica alternativa all'uso di un modello animale dovrebbero sempre riguardare la scientificità dell'esperimento proposto originariamente e il suo specifico fine.

## 1.2 Ridurre (*Reduction*)

Questo concetto si riferisce alla riduzione del numero di soggetti sperimentali utilizzati in un particolare protocollo sperimentale. Russell e Burch si riferirono alla riduzione del numero degli animali utilizzati per ottenere una quantità di dati numericamente significativi di

sufficiente precisione. È quindi importante notare che i due autori già sottolineavano il concetto che la riduzione del numero dei soggetti non può determinare una minore, oppure inefficace, potenza statistica. È essenziale quindi, qualora si voglia ridurre il numero dei soggetti sperimentali, ricercare il consiglio di un esperto in statistica, qualora il ricercatore, o la ricercatrice, non si sentisse sicuro su come operare. Mediante uno studio pilota si può determinare, per esempio, il numero di variabili estranee al protocollo che possono influenzare la validità del risultato e come tale variabilità può richiedere un campione di una certa consistenza numerica per essere considerata. Questo tipo di informazioni può quindi essere utilizzato per calcolare con precisione il numero di soggetti sperimentali necessari per ottenere risultati significativi in quel particolare caso.

Un altro modo per ridurre il numero di soggetti sperimentali utilizzati da diversi laboratori è quello di armonizzare il più possibile, a livello internazionale, le metodologie utilizzate sia per test di tossicità che per ricerche di tipo biomedico. Ciò ridurrebbe significativamente la possibilità di ripetere gli stessi test in differenti Paesi. Inoltre, i risultati non significativi dovrebbero essere resi disponibili, in modo da evitare il ripetersi di test i cui risultati non sono pubblicati.

Un'interessante evoluzione del concetto di *reduction* è che può essere pensato come applicabile non solo a livello del singolo esperimento, o di un particolare progetto di ricerca. Infatti, lo si può applicare a livelli più generali, anche se ciò richiede uno sforzo diverso e alle volte più complesso. Quindi, possiamo distinguere:

1. Riduzione intra-sperimentale: riguarda il numero di animali all'interno di ogni singolo esperimento, oppure dei singoli protocolli all'interno di un esperimento più complesso.
- La possibilità di ridurre dipende dalla domanda scientifica posta inizialmente e dal tipo di metodologia necessaria per rispondere a tale domanda. Ne segue che la possibilità di ridurre, varia da esperimento a esperimento. Comunque, si può ridurre migliorando il disegno statistico, eseguendo studi pilota, mediante un'analisi retrospettiva di dati ottenuti in precedenza. È importante ribadire che quest'analisi è da condurre specificatamente per ogni singolo esperimento si voglia eseguire.
2. Riduzione sovra-sperimentale: si attua applicando il concetto in modo più generale al modo di fare ricerca con gli animali, a livello nazionale. Tra gli esempi di quest'azione possono essere menzionati corsi di aggiornamento per il personale sui metodi statistici e sui vari tipi di disegni sperimentali, la possibilità di utilizzare i

soggetti sperimentali come controllo di se stessi. In questo secondo caso rientrano anche l'azione dei comitati etici, la possibilità di uno scambio di informazioni fra differenti gruppi di ricerca, l'ottimizzazione dei programmi di riproduzione.

3. Riduzione extra-sperimentale: in questo caso la riduzione si ottiene mediante un'evoluzione della pratica sperimentale a livello internazionale, mediante l'armonizzazione delle regole nazionali alla sperimentazione animale tra i Paesi Europei, Stati Uniti e Giappone (Paesi nei quali questi tipi di studi sono maggiormente frequenti).

### **1.3 Rifinire (*Refinement*)**

Anche il concetto di *refinement* si è evoluto nel tempo. Russell e Burch avevano già indicato nel loro testo che rifinire le procedure sperimentali voleva dire non solo occuparsi del benessere animale durante un esperimento, ma anche migliorare la qualità di vita di un individuo durante tutte le procedure che accompagnano la vita di un animale in cattività. In questo senso, Buchanan-Smith e colleghi (2005) hanno proposto una nuova definizione di *refinement*: “*Any approach which avoids, alleviates or minimises the actual or potential pain, distress and other adverse effects suffered at any time during the life of the animals involved, or which enhances their well-being as far as possible*”.

Ciò che è particolarmente rilevante in questa definizione è il riferimento a uno sforzo attivo e necessario per il miglioramento dello stato di benessere dell'animale sperimentale, dove benessere non è semplicemente assenza di malessere.

Per esempio l'uso di arricchimenti ambientali, che ora è esplicitamente contemplato dalla nuova Direttiva europea 2010/63 (Annex III), è un modo collaudato di fornire all'animale un maggior controllo dell'ambiente, e stimolare la manifestazione di comportamenti che sono inerenti all'ecologia ed etologia della specie utilizzata (Olsson & Dahlborn 2002; Stewart & Bayne, 2004).

Per quanto riguarda l'utilizzo di arricchimenti ambientali, generalmente si pensa che le condizioni di vita degli animali in cattività sono migliori se a questi è data la possibilità di esprimere comportamenti osservati in condizioni naturali. Tuttavia, nonostante questo sia un punto di vista significativo, è bene anche pensare che non è sempre così. Infatti, considerando che parte del repertorio comportamentale di una specie può essere modificata da condizioni

ambientali contingenti, e in più tenendo presente la flessibilità comportamentale, per esempio, dei mammiferi, ne segue che animali in cattività possano essere diversi da conspecifici che vivono nell'ambiente di origine. In pratica, ci si può attendere che le necessità comportamentali di un individuo in cattività siano in parte diverse da quelle di un conspecifico selvatico. Inoltre è necessario, quando si tratta di migliorare la qualità di vita di un particolare individuo, tenere presente la sua storia personale. Per esempio, un particolare arricchimento ambientale, adottato in una certa colonia di primati, potrebbe non essere valido per una diversa colonia, appartenente alla stessa specie. L'arricchimento ambientale deve essere tarato su ogni singola situazione, affinché possa essere realmente efficace. D'altra parte, deve essere fatta attenzione nel non creare situazioni ambientali troppo eterogenee fra colonie diverse, con il rischio di compromettere la ripetibilità dei dati. Come spesso succede, si deve trovare un equilibrio fra validità del dato scientifico e benessere degli animali utilizzati. Un ulteriore aspetto per misurare l'efficacia di un particolare arricchimento si basa sulla misura del grado di motivazione di particolari individui nell'usufruire di uno specifico arricchimento. Adottando analisi derivate da teorie di micro-economia, si può misurare la quantità di lavoro che un individuo è disposto a compiere per usufruirne: maggiore è il lavoro compiuto, maggiore è il beneficio atteso da parte dell'animale (Mason et al., 1998).

Un altro esempio di *refinement* delle procedure che negli ultimi anni si è sempre più diffuso nei laboratori di ricerca è quello del rinforzo positivo. In questo caso, sfruttando le potenzialità dell'apprendimento associativo e mediante l'offerta di premi alimentari, all'animale viene insegnato a cooperare nelle procedure routinarie sperimentali. Il risultato di questa metodologia, per esempio, è l'offerta spontanea di un arto da parte di una scimmia per una certa inoculazione, oppure lo spostamento non forzato di un individuo da una gabbia all'altra (Laule et al., 2003; Prescott & Buchanan-Smith, 2003).

## 1.4 Interazioni tra le 3R

Le 3R non sono da considerare indipendenti fra loro. In pratica, i tre concetti possono interagire sia in maniera positiva sia in maniera negativa.

Si possono immaginare casi nei quali l'applicazione di una delle tre R può avere un impatto positivo su una o sulle due altre R. Per esempio, un programma educativo dedicato al personale tecnico che si occupa della manutenzione degli animali, dove siano enfatizzati i bisogni specie-specifici di animali sperimentali, può portare a una maggiore attenzione verso lo stato di benessere. Ciò porta a un'applicazione automatica del concetto di *Refinement*. Conseguentemente, grazie a uno stato generale di benessere più elevato, gli animali affrontano con minore stress una particolare condizione sperimentale: ciò porta ad una minore variabilità dei risultati sperimentali dovuta agli effetti stressanti dell'esperimento stesso. Una minore variabilità dei risultati sperimentali permette di ridurre il numero degli animali utilizzati per quel particolare protocollo sperimentale (*Reduction*), conservando comunque la necessità di applicare test statistici adeguati.

Un altro esempio riguarda l'interazione fra *Replacement* e *Refinement*. Abbiamo in precedenza visto come, nel caso di una sostituzione parziale in un particolare esperimento (*partial replacement*), si può pensare di sostituire una particolare specie con un'altra, caratterizzata da un minore sviluppo del sistema nervoso (per esempio un topo per una scimmia). Nonostante sia necessario essere prudenti nell'affermare che un topo abbia un livello di sofferenza minore di quello di una scimmia, se ciò fosse vero applicheremmo, in maniera quasi automatica, anche il concetto di *Refinement*, perché il livello di sofferenza imposto all'animale sarebbe minore. Indubbiamente, la sostituzione di un vertebrato con un invertebrato renderebbe quest'esempio ancora più appropriato.

Spostandoci su un livello più globale, uno sforzo verso un'armonizzazione internazionale dei protocolli sperimentali che riguardano i test di sicurezza per i farmaci può portare ad una diminuzione dei test che sono compiuti nei singoli Paesi. Inoltre, lo scambio di tecniche e metodologie meno invasive, che prevedono l'applicazione di alternative all'uso di modelli sperimentali senzienti (*sharing best practices*), può ridurre il livello generale di sofferenza imposto agli animali da laboratorio. Quindi un'armonizzazione internazionale sulle metodologie utilizzate può facilitare l'applicazione sia del concetto di *Reduction* che di quello di *Refinement*.



Ci sono alcuni casi nei quali le 3R entrano in conflitto. Per esempio, ciò succede quando bisogna validare un certo metodo alternativo, oppure verificare l'efficacia di una tecnica particolare che ha lo scopo di diminuire lo stato di sofferenza dell'animale sperimentale. Quando non sono a disposizione dati già esistenti ai quali fare riferimento, si necessita di comparare i due metodi o le due tecniche (tradizionali vs alternative). In questo caso, entrano in conflitto i concetti di miglioramento della procedura sperimentale (*refinement*) e riduzione del numero di soggetti sperimentali (*reduction*). Un altro possibile conflitto deriva dall'utilizzo di metodi telemetrici per la rilevazione di dati fisiologici a distanza. Tali metodi prevedono spesso l'inserimento di una sonda sotto cute, o nellevisceri dell'animale. Inoltre, possono essere raccolti molti dati da un numero relativamente minore di individui. Ecco, quindi che sia la condizione di miglioramento delle condizioni sperimentali, che di riduzione degli individui, sono soddisfatte. D'altra parte, però, l'impianto di una sonda, specialmente quando inserita nelle visceri, richiede un intervento chirurgico significativamente invasivo. Inoltre, specialmente nel caso di piccoli roditori, il peso della radiotrasmittente può causare disagio fisiologico e fisico. In questo caso quindi sottoponiamo un individuo a una condizione di notevole disagio, anche se con la prospettiva di diminuire globalmente il numero di individui.

## Capitolo 2

### Nuova direttiva 2010/63/UE

Ogni anno nell'Unione Europea (EU), che si compone attualmente di 27 Stati Membri, circa 12 milioni di animali vengono impiegati nelle procedure scientifiche (dati che risultano in possesso della Commissione europea).

Le segnalazioni e petizioni ricevute dai servizi della Commissione e i sondaggi effettuati tramite l'eurobarometro<sup>1</sup> hanno fatto emergere una chiara indicazione sulla necessità di modificare le attuali politiche in materia di tutela degli animali nella sperimentazione e di fare tutto il possibile per ridurre al minimo il loro numero negli esperimenti. La partecipazione a recenti sondaggi e consultazioni pubbliche è un forte segnale dell'interesse dimostrato dal pubblico per questo settore: due delle tre più ampie consultazioni pubbliche mai tenute dalla Commissione europea sulle proprie attività politiche hanno riguardato il benessere degli animali<sup>2</sup>.

Probabilmente l'approccio più pragmatico per venire incontro a tali esigenze e diminuire il numero degli animali utilizzati nella sperimentazione si basa sull'introduzione progressiva di metodi alternativi.

La linea è stata condivisa dagli esecutivi degli Stati Membri, per garantire la maggior protezione e il miglior benessere possibile agli animali che vengono lecitamente usati, preservando gli scopi dell'esperimento e il suo corretto svolgimento.

La Direttiva 86/609/CEE ha costituito fino a poco tempo fa il più importante atto legislativo della Comunità europea volto ad armonizzare le norme degli Stati membri per la protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Il documento, adottato nel 1986, non aveva mai subito sostanziali modifiche. Dall'adozione della Direttiva 86/609/CEE sono stati compiuti considerevoli progressi nelle tecniche sperimentali ed emersi nuovi dati scientifici sulla capacità degli animali di provare dolore e sofferenza. L'inadeguatezza del testo era chiara e le disposizioni della Direttiva non tenevano sufficientemente conto dei risvolti etici dell'uso degli animali negli esperimenti, non facendo neanche esplicito

---

<sup>1</sup> Nome con cui è noto il servizio della Commissione europea, istituito nel 1973, che misura ed analizza le tendenze dell'opinione pubblica in tutti gli Stati membri e nei paesi candidati.

<sup>2</sup> La consultazione sul programma d'azione comunitario per la protezione e il benessere degli animali ha ricevuto 44.514 risposte e quella sulla revisione della Direttiva 86/609/CEE ha ricevuto 42.655 risposte.

riferimento né garantendo la piena applicazione del principio “delle tre R” (*Replacement, Reduction and Refinement*), benché questo sia ora accettato come il principio cardine in questo settore da tutte le parti in causa.

Tali lacune nelle norme comunitarie sono state ovviate da alcuni Stati membri, oltrepassando le disposizioni della Direttiva, in fase di recepimento del testo nei dispositivi giuridici nazionali. L’adozione di norme nazionali più restrittive ha prodotto un contesto concorrenziale fortemente diversificato e difforme per le imprese e i ricercatori, contravvenendo all’obiettivo della Direttiva di armonizzare il sistema nell’UE e di evitare la frammentazione del mercato interno.

I problemi economici hanno afflitto il mercato nazionale e quello internazionale minacciando così l’integrità e il rispetto del concetto del mercato interno pilastro delle politiche comunitarie. Erano emersi chiaramente svantaggi concorrenziali per gli Stati Membri che applicavano standard elevati in materia di benessere degli animali dovuti principalmente alle differenze di regolamentazioni e da procedure e criteri di autorizzazione divergenti negli Stati membri. Questi avevano portato costi e ritardi variabili nell’attuazione dei progetti, condizioni lavorative non entusiasmanti per i ricercatori, ostacoli alla mobilità orizzontale, una crescente attitudine minacciosa ai limiti della legalità da parte degli attivisti estremisti e il lievitare dei costi della ricerca.

I problemi legati al benessere degli animali si riferivano ai diversi livelli di benessere, derivati dalle diverse norme in vigore e dal numero relativamente elevato di animali non protetti dalla legislazione nazionale ed dalla diversa percezione del rispetto di tali regole.

Quest’ultimo, forse, rimane uno dei motivi fondamentali che ancora generano forti preoccupazioni e perplessità da parte degli Stati Membri sull’effettiva necessità di continuare ad applicare norme e regole sempre più evolute per il benessere animale. La diversa percezione e applicazione del benessere animale nei Paesi terzi comporta, infatti, sicuramente distorsioni di mercato a svantaggio dell’Unione Europea.

A tal proposito la Commissione è costantemente invitata dai Paesi UE a vigilare sulla corretta applicazione delle norme di benessere nei Paesi terzi. Il mancato rispetto delle norme comporta un aumento del differenziale dei costi di produzione, già generato di per sé da altre cause, che diventano insostenibili per garantire una corretta competitività a livello mondiale. Le discussioni negoziali tra l’UE e i Paesi terzi vertono sempre più sulla questione e la politica europea in tale settore è costantemente portata all’attenzione dei *fora* internazionali (Organizzazione mondiale del commercio-settore accordi sanitari e fitosanitari-SPS; Ufficio internazionale delle Epizozie-OIE; *Codex alimentarius*, ecc.).

Uno dei principali obiettivi della Commissione europea in questo settore era ed è anche quello di creare condizioni di parità per i ricercatori e le imprese.

Le basi scientifiche su cui poggiava la precedente Direttiva 86/609/CEE risalgono a più di 25 anni fa. Alcune disposizioni erano ormai superate. La Direttiva non teneva più conto delle moderne tecniche nel campo della sperimentazione animale né incorporava i più recenti progressi nel settore del benessere degli animali.

Inoltre, il testo della Direttiva si basava su di una convenzione internazionale e, di conseguenza, alcune disposizioni avevano più carattere politico che normativo, benché ancora oggi quest'aspetto abbia enormi influenze nella negoziazione.

L'art. 13 del Trattato di Lisbona, che ha recentemente adeguato e aggiornato le precedenti versioni dei Trattati che indirizzano e codificano le politiche comunitarie (Roma, Amsterdam, Maastricht e Nizza) ora, infatti, impone alla Comunità e agli Stati membri l'obbligo di tenere pienamente conto del benessere animale, modalità che in precedenza avveniva in modo non del tutto soddisfacente. In conformità agli obiettivi fissati del programma di Lisbona, emergeva anche l'obbligo di tenere in considerazione l'analisi dei costi e dei benefici potenziali dell'azione o dell'inazione e del rispetto dello sviluppo socio-economico nell'intera Comunità.

Il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), ad esempio, ha come effetto temporaneo un crescente uso degli animali nella sperimentazione, nonostante le norme già adottate per evitare sperimentazioni inutili. Anche per questo motivo, e alla luce delle disposizioni della Direttiva sui cosmetici, si è resa sempre più urgente la necessità di tentare di ridurre la dipendenza dalla sperimentazione animale, con l'obiettivo ultimo di sostituirla completamente.

La nuova norma doveva integrare inoltre pienamente il principio delle tre R in linea con altre politiche comunitarie. L'obbligo di sostituire, ridurre e perfezionare l'uso degli animali nelle procedure scientifiche è evidenziato in numerose altre normative comunitarie: Direttiva 98/8/CE sui biocidi, Direttiva 1999/45/CE sui preparati pericolosi, settima modifica della Direttiva 76/768/CEE sui cosmetici oltre il già citato Regolamento REACH.

A testimonianza degli sforzi messi in campo per migliorare la situazione, già dal 1991, la Commissione ha istituito il Centro europeo per la convalida dei metodi alternativi (ECVAM) presso il Centro comune di ricerca della Commissione (Ispra). Le misure da questo proposte per promuovere procedure alternative variano dall'obbligo generale di utilizzare metodi alternativi non appena disponibili ad iniziative più concrete per favorirne lo sviluppo, la convalida e l'accettazione anche a livello internazionale. In linea generale, ciò è stato tenuto

conto nella nuova Direttiva che impone ora di tenere pienamente conto del principio delle tre R nello sviluppo di qualsiasi misura comunitaria per tutelare la salute e la sicurezza dell'uomo, degli animali e dell'ambiente.

La nuova norma limita ora l'impiego di primati non umani e delle grandi scimmie circoscrivendo l'utilizzo di altre specie esclusivamente a specifici campi di applicazione e impone requisiti severi sull'origine degli animali, nonché meccanismi di monitoraggio per garantire l'efficacia delle misure proposte promovendo, in ultima analisi, la definitiva abolizione dell'uso dei primati non umani nelle procedure scientifiche. Si riconosce, tuttavia, che le attuali conoscenze scientifiche non ci consentiranno di raggiungere pienamente l'obiettivo nel prossimo futuro.

Emerge chiaramente come i compiti e gli obiettivi che hanno caratterizzato i nuovi indirizzi affidati alla Commissione per la preparazione del nuovo atto legislativo siano stati particolarmente complicati e la sfida ardua.

Il compito non è stato reso sicuramente più semplice dalla consultazione obbligatoria che la Commissione ha affrontato con gli *stakeholders*<sup>3</sup>, il Parlamento Europeo e le varie Amministrazioni nazionali nelle fasi della prima stesura del testo e di negoziazione.

Sarà compito del Centro europeo ECVAM di Ispra sviluppare nuove ricerche e coordinare le attività scientifiche nel campo della sperimentazione con lo scopo di introdurre progressivamente l'obbligo di metodi alternativi all'uso degli animali nella sperimentazione.

Qui giocherà molto il ruolo degli Istituti di ricerca nazionali nel fornire adeguati supporti scientifici che potranno indirizzare le scelte sia per il centro di ricerca di Ispra che per formulare serene scelte politiche basate sulla scienza.

---

<sup>3</sup> Associazioni industriali, associazioni per il benessere degli animali, associazioni di pazienti, istituti scientifici e di ricerca, associazioni operanti per l'applicazione del principio delle tre R e dei metodi alternativi, l'Agenzia europea per i medicinali, il Centro comune di ricerca e altri servizi della Commissione, allevatori di animali da laboratorio di Paesi terzi, così come molte altre associazioni diffuse sul territorio europeo.

## **2.2 Significato e conseguenze della Direttiva Europea 2010/63/UE per l'Italia**

Il 22 settembre 2010 è stata pubblicata la Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, finalizzata al rafforzamento della protezione degli animali; essa tiene conto della sensibilità dell'opinione pubblica sulle tematiche riguardanti il benessere degli animali, riconosciuta anche dal protocollo sulla protezione e il benessere degli animali del trattato CE di Lisbona, che considera gli animali quali esseri viventi senzienti.

La Direttiva 2010/63/UE si propone quindi di assicurare, in tutta l'Unione europea, condizioni di parità per le imprese e per i ricercatori e incrementare la qualità della ricerca scientifica, rafforzando la protezione degli animali ancora usati nelle procedure scientifiche e fornendo un forte impulso per una maggiore promozione nello sviluppo, nella convalida, nell'accettazione e nell'applicazione di metodi alternativi per la piena applicazione del principio delle tre R (*Replacement, Reduction and Refinement* - sostituzione, riduzione e perfezionamento) nell'uso degli animali negli esperimenti con l'obiettivo finale della completa sostituzione delle procedure su animali vivi.

### **2.2.1 Contesto europeo e necessità di revisione**

La precedente normativa, Direttiva 86/609/CEE, poggiava su acquisizioni scientifiche risalenti agli anni '80, inoltre il testo, sottoposto a libera interpretazione, aveva generato distorsioni del mercato interno, con notevoli differenze di regolamentazione tra gli Stati membri.

Nel 2002, in una risoluzione sulla Direttiva 86/609/CEE, il Parlamento europeo invitava la Commissione a preparare una proposta di Direttiva "aggiornata", che prevedesse misure più rigorose e trasparenti nel settore della sperimentazione animale.

Sono da segnalare anche altri fattori, di seguito elencati, che rendono necessario un aggiornamento della Direttiva.

– Emanazione della Direttiva 2003/15/CE sui cosmetici, recepita con il DL.vo n. 50/2005 che introduce il divieto di testare cosmetici finiti sugli animali; tale divieto è esteso, in date successive, alle prove tossicologiche sugli ingredienti o combinazioni di ingredienti, alla commercializzazione sul mercato comunitario di prodotti cosmetici e loro ingredienti testati

sugli animali.

- Revisione delle regole sulla registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze e prodotti chimici con l'approvazione da parte del Parlamento europeo del Regolamento CE n.1907/2006, denominato Regolamento REACH, entrato in vigore il 1° giugno 2007.
- La revisione e l'aggiornamento delle linee guida per una corretta stabulazione e cura degli animali contenute nell'Allegato A alla Convenzione del Consiglio d'Europa ETS 123 e approvata a Strasburgo nel giugno 2006 .
- La trasmissione al Parlamento Europeo e al Consiglio, da parte della Commissione UE, di un programma d'azione comunitario per la protezione e il benessere degli animali per gli anni 2006-2010 (*Community Animal Welfare Action Plan 2006-2010*) dove si evidenzia l'impegno della Commissione a realizzare un inventario chiaro e completo di tutte le iniziative progettate dalla Commissione stessa. Tra i principali obiettivi del *Community Animal Welfare Action Plan 2006-2010* si segnalano quelli relativi ad una maggiore definizione e chiarezza delle politiche comunitarie sulla protezione e sul benessere degli animali, a promuovere un livello elevato di benessere degli animali nell'UE e in ambito internazionale e ad appoggiare il principio: "sostituzione, affinamento e riduzione", a promuovere metodi alternativi alla sperimentazione animale.

Nella formulazione della proposta si è tenuto conto dei pareri di esperti, di una consultazione pubblica su internet (2006), e degli studi per valutare l'impatto delle misure proposte a livello socio-economico e sul benessere degli animali.

In generale si registrava un ampio consenso sulla necessità di rivedere la normativa, individuando nello strumento legislativo della Direttiva un meccanismo flessibile che consente agli Stati Membri sufficiente margine per l'attuazione di misure a livello nazionale e cercando allo stesso tempo di mantenere un equilibrio tra promozione della ricerca, competitività europea e benessere animale in linea con il principio di sussidiarietà secondo il quale *"l'Unione interviene soltanto se e in quanto gli obiettivi dell'azione prevista non possono essere conseguiti in maniera sufficiente dagli Stati membri, né a livello centrale né a livello regionale o locale, ma possono essere conseguiti meglio a livello di Unione"* (Articolo 3-ter del trattato di Lisbona). Lo strumento legislativo della Direttiva è conforme al principio di proporzionalità in quanto agli Stati membri è lasciato ampio margine di manovra per individuare le misure specifiche più adeguate a livello amministrativo che tengano conto delle rispettive infrastrutture amministrative e delle specificità locali e regionali inerenti agli aspetti etici e socio-economici.

È prevista la possibilità per gli Stati membri di prendere misure più rigorose di quelle stabilite nella Direttiva proposta, purché dette misure soddisfino le condizioni dell'articolo 95, paragrafo 4, del trattato CE.

Il 5 novembre 2008 la Commissione europea ha presentato una proposta di Direttiva riguardante la protezione degli animali impiegati ai fini scientifici che è stata inviata al Parlamento Europeo e al Consiglio per l'approvazione con procedura di codecisione.

Nel maggio 2009 il Parlamento Europeo approva in prima lettura e con ampia maggioranza un testo modificato da 202 emendamenti che però non trova l'accordo della Commissione UE. È stato necessario un lungo e difficile lavoro di mediazione da parte del Consiglio per arrivare ad un testo di compromesso fra le tre istituzioni che viene finalmente approvato l'8 settembre 2010 dal Parlamento Europeo.

La Direttiva 2010/63/UE dovrà essere recepita dagli stati membri entro il 9 novembre 2012 e tali disposizioni entrano in vigore a partire da 1 gennaio 2013.



## Capitolo 3

### Iter procedurale per la validazione delle metodiche alternative

Le aspettative rivolte allo sviluppo, validazione e accettazione normativa dei metodi alternativi sono recentemente aumentate, sia in ambito legislativo che, in generale, nell'intera comunità sociale.

Un metodo alternativo è dato dalla combinazione di un sistema di saggio con un modello predittivo. Il sistema di saggio comprende tutte le procedure, incluso il protocollo sperimentale, necessarie ad ottenere informazioni su di una specifica sostanza. Il modello predittivo è una formula adatta a convertire i risultati generati dal sistema di saggio nella predizione dell'effetto tossico. Esso è sviluppato sulla base di dati di riferimento il più possibile "robusti" o sulla comparazione con sostanze di riferimento di cui sia noto il profilo tossicologico.

La validazione, cioè il processo attraverso cui si verifica l'affidabilità (riproducibilità del metodo nel tempo e in laboratori diversi) e la pertinenza (significatività e utilità di una procedura per il fine prefissato) di un metodo per uno scopo specifico (*Balls et al., 1990*), è la "strada" obbligata attraverso cui devono passare tutti i metodi alternativi prima di iniziare l'iter verso l'accettazione nelle legislazioni nazionali e internazionali.

Scopo del processo di validazione è verificare prestazioni, utilità e limitazioni di un saggio quando questo viene utilizzato in ambito regolatorio come supporto all'identificazione e alla valutazione del rischio.

I principi di base della validazione e le relative procedure sono stati definiti nella prima metà degli anni 90 da diversi organismi internazionali come ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) e OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*); questi principi hanno validità generale per tutti i metodi *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, nuovi o aggiornati, utilizzati per la valutazione del rischio per la salute umana e/o l'ambiente.

Tra questi principi, alcuni dei più importanti sono:

- il rationale del metodo, la sua necessità scientifica e lo scopo regolatorio che si vuole ottenere devono essere ben chiari;

- la relazione tra il parametro saggiato, l'effetto biologico e la rilevanza tossicologica devono essere specificati;
- deve essere formalizzato e reso disponibile un dettagliato protocollo sperimentale del metodo (*Standard Operating Procedure SOP*);
- la variabilità, ripetitività e trasferibilità del metodo tra e intra laboratorio devono essere dimostrate utilizzando un significativo numero di sostanze chimiche, possibilmente codificate, rappresentative del tipo di sostanze per cui il metodo verrà utilizzato;
- le prestazioni del metodo devono essere valutate sulla base dei dati esistenti e in relazione all'organo bersaglio. Qualora si attui la sostituzione di un metodo normato con un metodo alternativo dovrà, inoltre, essere valutata la capacità del metodo di coprire l'intervallo atteso di risposte (alta, moderata, bassa e negativa) in relazione al gruppo di sostanze chimiche su cui il saggio verrà applicato (dominio di applicabilità);
- i dati e gli esperimenti devono essere ottenuti/condotti secondo i principi di buona pratica di laboratorio "GLP" (*Good Laboratory Practice*).

La formalizzazione del processo di validazione si è sviluppata contestualmente con il concetto di metodo alternativo e con la necessità della sua accettazione regolatoria; viceversa, la maggior parte dei metodi *in vivo* presenti nella legislazione per accertare la sicurezza d'uso dei prodotti in commercio (sperimentazione regolatoria, secondo la definizione della legge 2010/63), non ha subito un analogo processo di valutazione dell'affidabilità e rilevanza, rendendo spesso difficile utilizzare i risultati di questi studi nella valutazione del rischio e/o nella comparazione con i dati *in vitro*.

Il processo di validazione è piuttosto lungo e rigido; infatti possono intercorrere fino a dieci anni (di cui circa 3 per la validazione del metodo, 2 per la compilazione del rapporto e la valutazione degli esperti e almeno altri 2 anni per l'accettazione normativa e l'armonizzazione internazionale) per il completamento delle 5 principali fasi che lo compongono (*Balls et al., 1995*). Queste fasi sono state elaborate nel corso di un approfondito dibattito tra numerosi esperti e più volte modificate in seguito all'esperienza acquisita.

Sinteticamente esse sono:

1. Sviluppo del saggio, dove per saggio si intende un sistema sperimentale in grado di generare informazioni relative agli effetti avversi di una sostanza chimica. I dati prodotti devono essere utilizzabili per la valutazione del rischio ed essere almeno, ma preferibilmente migliori, di quelli ottenuti con i metodi esistenti in modo da consentire un migliore livello di protezione per l'uomo e l'ambiente;
2. Prevalidazione mirata alla verifica della trasferibilità del metodo e all'ottimizzazione del suo protocollo;
3. Validazione formale coinvolgente più laboratori ed effettuata con sostanze chimiche codificate. I laboratori che partecipano allo studio di validazione (generalmente 3 o 4, ma dipende dal tipo di saggio) devono rispondere a dei requisiti minimi di esperienza per lo specifico saggio, competenza del personale, disponibilità strumentale, controlli di qualità degli iter procedurali, per l'archiviazione delle informazioni e il benessere degli animali (se il loro impiego è necessario);
4. Valutazione di esperti indipendenti, non direttamente coinvolti nelle precedenti fasi di sviluppo e validazione del metodo;
5. Avvio delle procedure per l'accettazione regolatoria, in particolare per il loro inserimento nelle Direttive Europee e/o nelle linee guida OECD o, nel caso di metodi per la valutazione dei prodotti biologici, nella Farmacopea Europea.

Tramite questo schema sono stati validati un certo numero di metodi alternativi, alcuni dei quali presenti nelle legislazioni internazionali (Tabelle 1 e 2).

Questo tipo di validazione, che prevede l'esecuzione di lavoro sperimentale per generare i dati mancanti all'adeguata valutazione della validità del metodo, viene definito "validazione prospettiva" ed è quello più frequentemente utilizzato per normare i nuovi metodi.

Recentemente si è considerata la possibilità di stabilire dei criteri che consentissero di ottimizzare le informazioni esistenti su saggi non ancora validati ma consolidati nel tempo in ambiti non regolatori. Questo tipo di validazione, definita "validazione retrospettiva", viene effettuata tenendo conto di tutte le informazioni e i dati disponibili a supporto della sua validità, (inclusi risultati di precedenti studi di validazione), e non richiede lavoro sperimentale.

Un terzo tipo di validazione, "validazione comparativa o catch-up validation", consiste nel validare per comparazione o un metodo precedentemente validato, ma modificato per uno o

più aspetti in maniera non sostanziale, o un metodo nuovo ma molto simile ad uno già validato.

Parametro	Saggio	Area 3R	Approvazione ESAC	Legislazione EU	Linee guida OECD	
Irritazione cutanea	EpiDerm SIT and SkinEthic™ RHE	Sostituzione	5 novembre 2008	761/2009/EC Metodo B.46 allegato 440/2008/EC luglio 2009	n. 439 – luglio 2010	
	EpiSkin®, EpiDerm® pelle umana ricostituita		27 aprile 2007			
Corrosione cutanea	EST-1000 pelle umana ricostituita	Sostituzione	12 giugno 2009	440/2008/EC Metodo B.40bis - giugno 2009	n. 431 – giugno 2009	
	SkinEthic™ pelle umana ricostituita		17 novembre 2006	440/2008/EC Metodo B.40bis - novembre 2006	n. 431 – Novembre 2006	
	CORROSITEX pelle umana ricostituita		6 dicembre 2000 Studio ICCVAM	440/2008/EC Metodo B.40bis - maggio 2008	n. 435 – luglio 2006	
	EpiDerm™ pelle umana ricostituita	Riduzione	21 marzo 2000	440/2008/EC Metodo B.40bis - aprile 2000	n. 431 – aprile 2004	
	EPISKIN™ pelle umana ricostituita		3 aprile 1998	440/2008/EC Metodo B.40bis - aprile 2000	n. 431 – aprile 2004	
	Misura della resistenza transepiteliale su pelle di ratto		3 aprile 1998 Da utilizzarsi solo in batterie di saggi	440/2008/EC Metodo B.40 - aprile 2000	n. 430 – aprile 2004	
Irritazione oculare	<i>Bovine Corneal Opacity &amp; Permeability (BCOP)</i>	Raffinamento	27 aprile 2007 Validazione retrospettiva (ICCVAM)	440/2008/EC	n. 437 – settembre 2009	
	<i>Isolated Chicken Eye (ICE)</i>				n. 438 – settembre 2009	
Tossicità acuta orale	<i>Acute toxic class method</i>	Riduzione	31 ottobre 2007	440/2008/EC Metodo B.1tris - aprile 2004	n. 423 – dicembre 2001	
	<i>Fixed dose procedure</i>				440/2008/EC Metodo B.1bis – aprile 2004	n. 420 – dicembre 2001
	<i>Up and down procedure</i>					n. 425 – dicembre 2001
Assorbimento cutaneo	<i>In vitro Skin Absorption</i>	Sostituzione		440/2008/EC Metodo B.45 - maggio 2008	n. 428 – aprile 2004	
Tossicità acuta acquatica	Strategia a tappe per ridurre l'uso dei pesci	Riduzione	21 marzo 2006	440/2008/EC	n. 126 – maggio 2010	
Sensibilizzazione cutanea	<i>Local Lymph Node assay (LLNA)</i>	Riduzione		440/2008/EC Metodo B.42 - aprile 2004	n. 429 – aprile 2002	
Fototossicità	<i>3T3 Neutral Red Uptake</i>	Sostituzione	3 novembre 1997 20 maggio 1998	440/2008/EC Metodo B.41 - aprile 2000	n. 432 – aprile 2004	

*segue*

continua

Genotossicità	Micronucleo su cellule di mammifero	Sostituzione	17 novembre 2006 Validazione retrospettiva	n. 487 – luglio 2010
Pirogeni	Saggi <i>in vitro</i> per i pirogeni	Sostituzione	21 marzo 2006	EDQM <i>European Pharmacopoeia</i> , metodo 2.6.30 Monocyte-activation test – marzo 2009
Vaccini (potenza e sicurezza)	Vaccini per uso veterinario	Riduzione	3 giugno 2002	<i>European Pharmacopoeia monograph: Vaccines for veterinary use (0062;2005)</i>
	ELISA test per l'erisipela	Sostituzione	28 giugno 2002	<i>European Pharmacopoeia</i> , 4.6; n. 01/2004:0064
	ELISA test antitetanico (uomo)		6 dicembre 2000	<i>European Pharmacopoeia</i> , 2.7.8 (general text) – marzo 2003
	ToBI test antitetanico (uomo)			

**Tabella 1.** Principali metodi validati e relativi riferimenti normativi

Parametro	Saggio	Area 3R	Approvazione ESAC
Irritazione oculare	Rilascio di Fluoresceina	Sostituzione	10 luglio 2009 Validazione retrospettiva Da utilizzarsi solo in batterie di saggi
Produzione di anticorpi monoclonali	Metodi <i>in vitro</i> per la produzione di anticorpi monoclonali	Sostituzione	12 maggio 1998 Validazione retrospettiva
Ematotossicità	CFU-GM <i>in vitro</i> test per la valutazione della neutropenia	Sostituzione	21 marzo 2006
Tossicità riproduttiva (embriotossicità)	Cellule staminali embrionali	Sostituzione	1 maggio 2002

**Tabella 2.** Metodi scientificamente validati

Nell'intento di abbreviare l'iter del percorso di validazione è stato proposto da ECVAM un approccio modulare (*Hartung et al., 2004*) che rendesse più flessibile e, conseguentemente, più rapido l'intero processo. Questo schema operativo, che prevede la suddivisione del percorso di validazione in 7 moduli distinti (definizione del saggio; variabilità intra-laboratorio; trasferibilità; variabilità tra laboratori diversi; capacità predittiva; campo di applicazione; standard di riferimento), risulta sicuramente più snello del precedente, pur mantenendo inalterato l'alto livello di qualità. L'intero processo di validazione è sottoposto alla valutazione degli esperti solo dopo aver raccolto tutte le informazioni necessarie dai singoli moduli, che possono essere eseguiti in maniera indipendente anche in parallelo. L'approccio modulare, inoltre, può essere applicato a diversi tipi di saggi e procedure, incluse quelle che utilizzano nuove tecnologie, come le tecnologie-omiche, indipendentemente dal fatto che si tratti di validazione prospettiva, retrospettiva o comparativa.

Data la complessità e il costo che uno studio di validazione comporta, esso è generalmente condotto sotto la supervisione di organismi internazionali o entità governative (ECVAM, ICCVAM, OECD), che si fanno carico di assicurare che tutte le principali fasi del processo siano adeguatamente pianificate ed eseguite. Un esperto di biostatistica, possibilmente indipendente allo studio, deve essere sempre presente durante tutte le fasi di lavoro, dalla programmazione alla successiva analisi dei dati. È importante sottolineare che, tanto più i risultati dello studio saranno chiari e ottenuti nel rispetto delle procedure, tanto più facile e veloce sarà l'accettazione normativa.

### **3.1 Intelligent Testing Strategies (ITS)**

Sempre più frequentemente nei recenti contesti regolatori (in particolare nel regolamento REACH) si fa riferimento a “batterie di saggi”, in cui diversi test sono combinati in maniera sequenziale per:

- a) aumentare l'efficacia e la predittività della valutazione del rischio;
- b) ridurre i costi
- c) fare uso il più possibile di metodi alternativi assicurando, nel contempo, una sufficiente protezione per l'uomo e l'ambiente.

Tramite questo approccio è possibile integrare le valutazioni tossicologiche provenienti da molteplici fonti, facilitando così i processi decisionali inerenti a specifiche richieste regolatorie.

Il processo di validazione è però focalizzato sul singolo saggio ed è volto soprattutto all'identificazione del rischio piuttosto che alla sua valutazione; al momento non esistono linee guida specifiche per validare le strategie di saggi multipli (*Kinsner-Ovaskainen et al., 2009*). D'altra parte, divenendo sempre più evidente che la sostituzione diretta, 1 saggio *in vivo* → 1 saggio *in vitro* è difficilmente perseguibile, è urgente considerare lo sviluppo di specifici ITS in grado di combinare metodi *in vitro* e *in silico* per generare informazioni utili ai fini normativi. Sebbene siano reperibili in letteratura diversi ITS, costruiti in base a esigenze specifiche, pochi di essi hanno raggiunto la fase regolatoria o sono stati pubblicati in linee guida. In generale, all'interno di un ITS, si determina separatamente per ogni saggio la riproducibilità e la trasferibilità mentre la capacità predittiva viene valutata sul sistema nel

suo complesso. La validazione formale è richiesta solo nel caso in cui l'ITS sostituisca completamente un saggio *in vivo* utilizzato a scopo regolatorio.

### **3.2 Principali criticità del processo di validazione**

Nonostante i progressi e gli sforzi fatti in questi ultimi anni per velocizzare il processo di validazione senza derogare sulla sua qualità, ci sono a tutt'oggi numerose barriere che limitano il riconoscimento e l'accettazione internazionale dei metodi alternativi (Ahr *et al.*, 2008) e che sono oggetto di acceso dibattito internazionale. Tra questi è importante sottolineare:

- scarsa chiarezza degli scopi e delle applicazioni del metodo durante la fase di sviluppo;
- scarsa qualità e incompletezza nella pubblicazione dei dati di riferimento *in vivo* sia sugli animali che sull'uomo, essenziali per la determinazione della capacità predittiva;
- mancanza di standard di riferimento, cioè delle sostanze da utilizzare come controllo positivo e negativo;
- mancanza nella legislazione di saggi di riferimento per alcuni importanti endpoint tossicologici (irritazione respiratoria, immunotossicità, sensibilizzazione respiratoria) o, al contrario, presenza nella legislazione di più saggi relativi ad uno stesso *endpoint*, con conseguente difficoltà nell'identificazione del riferimento migliore;
- lunga durata del processo di validazione (2-10 anni);
- mancanza di adeguate risorse finanziarie per lo svolgimento degli studi di validazione;
- mancanza di criteri per la validazione delle nuove metodologie e/o dei nuovi approcci sperimentali in tossicologia (modelli *in silico*, tecnologie *omiche*, modelli transgenici, strategie integrate di saggio).

## Capitolo 4

### Modello animale e ipotesi di predittività

L'ipotesi di predittività del modello animale per quanto riguarda le reazioni a farmaci e sostanze ed i processi patologici umani non è mai stata verificata (*Balls 2004, Matthews 2008; Shanks et al. 2009, Pound et al. 2004; Knight 2007*) e rimane attualmente un fatto controverso (*van Der Worp et al. 2010*). Sebbene non siano reperibili in letteratura degli studi di validazione formali per quanto riguarda tale modello, esistono non poche evidenze e revisioni sistematiche che sembrerebbero, semmai, dimostrare l'infondatezza dell'ipotesi di predittività.

Ecco soltanto alcuni esempi presi in letteratura:

- Revisione sistematica, 2006: emerge che la concordanza tra i risultati positivi ottenuti sui modelli animali e quelli riscontrati poi sull'uomo nella pratica clinica è appena del 33%. Gli stessi autori concludono che un simile risultato dovrebbe far riflettere sul grado di estrapolabilità all'uomo dei dati ottenuti da studi su animali ed invitano alla cautela (*Hackam & Redelmeier 2006*).
- Da studi di concordanza tra modelli animali e uomo per gli effetti di 6 tipologie diverse di interventi e/o cure mediche (1 – corticosteroidi in trauma cranico, 2 – antifibrinolitici in emorragia, 3-trombolisi in ictus ischemico acuto, 4 -tirilazad in ictus ischemico acuto, 5 – corticosteroidi prenatali per prevenire la sindrome da stress respiratorio nei neonati, e 6 – trattamento con bifosfonati per prevenire l'osteoporosi) emerge una concordanza in circa la metà dei casi. Gli autori concludono che la discordanza osservata tra modelli animali e pratica clinica può essere dovuta a un errore sistematico oppure all'incapacità del modello animale di riprodurre i processi fisio-patologici umani (*Perel et al. 2007*). Per interpretare le conclusioni di tale articolo ci si può riferire a *Sena e collaboratori (2010)*, che spiega come la tendenza a pubblicare preferenzialmente i risultati positivi a discapito di quelli inconcludenti o negativi porti ad una sovrastima della concordanza tra i risultati ottenuti sugli animali e quelli riscontrati sull'uomo.
- Dall'analisi di 51 serie di esperimenti su animali condotta presso le Università di Wurzburg, Erlangen e Regensburg in Germania, è emerso che il 99,7% dei risultati



prodotti dalla ricerca su 5000 animali, non erano applicabili alla clinica e che per il restante 0,3% non vi è stata alcuna applicazione (Lindl et al. 2006). Lo studio è stato menzionato più tardi sotto forma di lettera sulla rivista *Altex*. L'autore conclude che i benefici per la salute collettiva derivanti dalla sperimentazione animale sono sovrastimati (Lindl e Voelkel 2011).

- Il National Cancer Institute americano (NCI) sperimentò su modelli murini 12 tipi di farmaci antitumorali utilizzati con successo sui pazienti umani. Furono impiegati topi con 48 tipologie differenti di tumore “umano” e furono somministrati loro i 12 farmaci. Nel 63% dei casi i modelli murini furono incapaci di predire accuratamente la risposta umana. NCI ritiene anche che tali test contribuiscano alla perdita di potenziali cure che inefficaci nei modelli animali, potrebbe esserlo nella specie umana. [Science vol. 278, 7 November 1997: 1041-1042].
- Il 92% dei farmaci che passano con successo attraverso i test su animali non supera le successive fasi cliniche a causa di effetti avversi e/o inefficacia [dato FDA].
- I modelli animali forniscono dati di farmacocinetica spesso inattendibili [Grass e Sinko 2002; Arun and Barry 2003 Shanks et al. 2009].
- Gli studi di tossicità condotti su animali non possono essere considerati predittivi a causa delle significative differenze tra le specie rispetto a parametri farmacocinetici quali assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione dei composti chimici o dei farmaci. Le ampie variazioni delle LD<sub>50</sub><sup>4</sup> (anche nelle specie tra loro affini come ratti e topi) sono indicative dell'inattendibilità dei test di tossicità attualmente previsti (Hartung 2009).
- L'anno 2007 ha segnato un punto di svolta nel campo della tossicologia, con la pubblicazione di una relazione, punto di riferimento dalla US National Research

---

<sup>4</sup> Dose letale mediana LD<sub>50</sub> - quantità di sostanza tossica che effettivamente entra nell'organismo (si distingue per tipologia, cioè per via orale, per iniezione, ecc.) in grado di provocare la morte del 50% degli organismi utilizzati in prova.

Council (NRC), sottolineando la necessità di focalizzarsi su metodologie in vitro ed in silico che siano predittive per il rischio tossicologico umano, rischio che gli attuali metodi basati su animali non sono in grado di predire efficacemente. Il rapporto “Test di tossicità nel 21° secolo: una visione ed una strategia”, è stato commissionato dalla US Environmental Protection Agency, in parte a causa del riconoscimento dei punti deboli negli approcci esistenti ai test sulla tossicità [Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents, National Research Council. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. Washington, DC: National Academy Press; 2007]. La visione NRC richiede uno spostamento dall’approccio classico, che prevede l’utilizzo degli animali nei test tossicologici, verso modelli computazionali e high-throughput in vitro. La relazione ha sottolineato che questi metodi possono fornire dati più predittivi, in modo più rapido e conveniente rispetto ai tradizionali metodi in vivo. Gli articoli pubblicati in un secondo momento affrontano l’attuazione di questa visione per migliorare l’attuale sistema [Hartung 2009, Andersen e Krewski 2009].

- La predittività degli animali negli studi di teratogenesi è inaccettabile [Bailey et al. 2005, Bailey 2008]
- Gli studi di cancerogenesi svolti su animali non sono in grado di predire il rischio di cancro nell’uomo e l’extrapolazione dei dati dall’animale all’uomo comporta notevoli difficoltà. [Salsburg 1983, Lester et al. 1988, Knight et al. 2005, Kight et al. 2006]
- Per decenni l’evidente correlazione tra fumo di sigaretta e cancro polmonare non è stata accettata. Ciò lo dobbiamo in gran parte al fatto che non è stato possibile riprodurre lo stesso fenomeno negli animali di laboratorio. Ciò risultò in un notevole ritardo nei provvedimenti legislativi a tutela della salute pubblica [Coulston and Shubick 1980].
- 2012 – Studio sulla validità della sperimentazione compiuta sugli scimpanzé, specie animale, tra quelle usate in laboratorio, geneticamente più vicina all’uomo:
  - a) la maggior parte delle ricerche compiute su scimpanzé e pubblicate (in aggiunta quindi alle ricerche mai presentate o non accettate per la

pubblicazione) non viene mai citata successivamente in studi di medicina umana. Nelle rare citazioni era chiaro che gli esperimenti su scimpanzé non avevano contribuito alla ricerca clinica umana.

- b) La valutazione del ruolo degli scimpanzé negli studi per i vaccini contro l'AIDS dimostra il fallimento di tale modello. Ad oggi, 85 differenti vaccini hanno dimostrato di essere sicuri ed efficaci negli scimpanzé ed in altre scimmie. Tuttavia, in 197 studi clinici, nessuno di questi è risultato essere utile all'uomo.
- c) La valutazione riguardo alla ricerca sul cancro ha dimostrato che gli scimpanzé, i nostri più vicini parenti genetici, hanno sprecato enormi finanziamenti per la ricerca. I tumori negli scimpanzé sono estremamente rari, e sono biologicamente diversi dai tumori umani.
- d) La valutazione riguardo alla ricerca per l'epatite C ha dimostrato che il ruolo degli scimpanzé è totalmente esagerato. L'uso degli scimpanzé è continuato per convenzione, non per merito scientifico o per necessità. [The Ban on the Use of Chimpanzees in Biomedical Research and Testing in the UK Should Be Made Permanent and Legally Binding. BUAV/F.R.A.M.E. ATLA 40, 3–8, 2012]

#### **4.1 Esempi di patologie umane per cui modelli animali sono da tempo riconosciuti fallimentari.**

- HIV in Primati e Felini (*Kim et al. 2010, Bailey 2008, Bennet e Hart 1995*)
- Lesioni del midollo spinale (*Akhtar et al. 2008; Akhtar et al. 2009*).
- Sclerosi multipla (Rice 2012)
- Asma (Holmes et al. 2011)
- Malattie neurodegenerative (Questions raised about the use of 'ALS mice' are prompting a broad reappraisal of the way that drugs are tested in animal models of neurodegenerative disease. Jim Schnabel reports.).

- Alzheimer (*Blennow et al. 2006, Hampel et al. 2010*).
- Sepsi (*Niels et al. 2003, Opal e Cross 1999*).
- Ictus (*Horn et al. 2001, O'Collins et al. 2006, Sena et al. 2010*).
- Ipertensione (*Stingl et al. 2009*).
- Distrofia muscolare (*Bohm et al. 2009*).
- Modelli murini di cancro (*Voskoglou-Nomikos et. al. 2003*).
- Modelli murini e sistema immunitario (*Khanna et al. 2011, Davis 2008, Leslie 2010, Mestas e Hughes 2004, Brady 2008*).

## 4.2 Primati e sperimentazione animale

Tra i Primati non umani si annoverano le specie animali più vicine all'uomo dal punto di vista filogenetico. In particolare con gli scimpanzé condividiamo il 98,7% dei geni, contro l'80% di corrispondenza con il topo (*Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium 2005, Asif et al. 2002*). Ciò ha fatto sì che gli scimpanzé ed altri Primati vengano considerati modelli ideali ed irrinunciabili nello studio delle patologie umane e delle reazioni a farmaci o vaccini.

Recenti revisioni sistematiche rivelano che il ruolo degli scimpanzé nello studio dell'epatite C (*Bailey 2010*), dell' AIDS (*Bailey 2008*) e del cancro (*Bailey 2009*) è sovrastimato e che il contributo dei primati alla ricerca medica è discutibile (Knight 2007, 2008). La vicenda del TGN1412<sup>5</sup>, un farmaco (anticorpo monoclonale) che aveva dato ottimi risultati anche sui Primati ma che nel 2006 ha quasi ucciso i volontari durante la I fase clinica (*Eastwood et al. 2010*), dovrebbe farci riflettere sulla possibilità di estrapolare dei risultati da una specie all'altra.

Vi sono accertate differenze per quanto riguarda quelle patologie che costituiscono importanti cause di morte o malattia nell'uomo: AIDS, epatite B e C, malaria, infarto del miocardio, influenza A. Non sono mai state inoltre osservate nelle scimmie antropomorfe, sia in

---

<sup>5</sup> Farmaco sperimentale realizzato dalla società di biotecnologie tedesca TeGenero per il trattamento di malattie immunologiche ( sclerosi multipla, artrite reumatoide, leucemia ). Il 15 marzo 2006, due comunicati, uno di TeGenero e l'altro del Northwick Park Hospital a Londra sede della sperimentazione ) informavano che i volontari che avevano preso parte alla sperimentazione avevano presentato eventi avversi inaspettati, come ha riportato la società farmaceutica. Negli studi pre-clinici, il farmaco si era dimostrato sicuro.

cattività, che allo stato libero, condizioni patologiche comuni invece nella specie umana, quali ictus ischemici, morbo di Alzheimer, carcinomi, artrite reumatoide ed altre malattie autoimmuni, endometriosi, tossiemia gravidica, aborto spontaneo per aneuploidia fetale, asma bronchiale, psicosi maggiori.

Almeno una ventina di geni collegati ai tumori umani ed implicati nella genesi dei tumori sono significativamente diversi negli scimpanzé (*Bertranpetit et al. 2006*). Altre rilevanti differenze si trovano nei geni per le proteasi, molte delle quali sono coinvolte nella regolazione immunitaria (*Puente et al. 2005*).

Tra le più note differenze tra il genoma dello scimpanzé e quello umano vi sono i geni codificanti per il sistema MHC-HLA (sistema di istocompatibilità, alla base della regolazione immunitaria): sembra che non vi siano alleli in comune (*Cooper et al. 1998*).

L'80% delle proteine ortologhe differisce tra gli umani e gli scimpanzé, tra queste vi sono anche delle proteine che sono legate al cancro al seno (*Glazko et al. 2005*).

Il 6-8% degli esoni ortologhi mostrano delle notevoli differenze nello *splicing*: ciò influisce su molte funzioni tra cui espressione genica, trasduzione del segnale, morte cellulare, sistema immunitario e quindi sulla suscettibilità a determinate malattie, tra cui il cancro (*Calarco et al. 2007*).

Inoltre sembrerebbe che le differenze tra uomo e primati per quanto riguarda le funzioni cognitive e la suscettibilità alle patologie neurodegenerative siano legate soprattutto a fattori epigenetici (*Hennady et al. 2012*). Uno studio di Arora et al. (2009) analizzò circa 10.500 geni in diversi organi umani e di scimpanzé: il 34% mostrò diversi livelli di espressione nel cervello, il 25% nel fegato, il 33% nel rene, il 35% nel cuore ed il 62% nel testicolo.

La differenza nell'espressione di un singolo gene può avere delle conseguenze molto importanti: ad es. il gene per il recettore *NKp44*, (un recettore su un particolare tipo di cellule immunitarie) è 5 volte più espresso nello scimpanzé che nell'uomo. Tale recettore è coinvolto nel riconoscimento e nell'uccisione delle cellule cancerose o infettate da virus (tra cui HIV-1). Il fatto che negli scimpanzé l'infezione da HIV-1 abbia normalmente un decorso benigno potrebbe essere in parte spiegato da tale differenza nell'espressione genica (*De Maria et al. 2009*).

E' molto probabile che la variazione interspecifica dell'espressione di un singolo gene che codifica per una determinata proteina (inhibitory sialic acid-recognising Ig-superfamily lectins – Siglecs) abbia rilevanti conseguenze sulla risposta immunitaria verso molti patogeni. Ad es. Soto e colleghi (2010) evidenziano come alcuni dei geni che codificano per queste

proteine siano meno espressi nell'uomo che nello scimpanzé. Sembra che ciò possa in parte spiegare le differenze tra uomo e scimpanzé nella risposta immunitaria verso HIV e virus dell'epatite C e predisponga l'uomo ad un'iperattività immunitaria, a sua volta legata a patologie autoimmuni (come artrite reumatoide e psoriasi) o all'asma.

### 4.3 Modelli murini e sistema immunitario

Tra la fine del XIX e l'inizio del XX secolo vi fu un enorme progresso per quanto riguarda la comprensione dei meccanismi immunitari umani, grazie ad estesi studi sull'immunità umorale e cellulo-mediata. Di particolare interesse fu lo sviluppo della teoria delle catene laterali di Ehrlich che portò poi alla descrizione dei meccanismi di interazione antigene-anticorpo.

Nel corso del XX secolo, con lo sviluppo dei modelli murini *inbred*<sup>6</sup>, si smise di focalizzarsi direttamente sull'immunità umana. E' importante riconoscere che tali modelli murini hanno fornito delle valide intuizioni, ad esempio per quanto riguarda il ruolo del sistema di istocompatibilità nel riconoscimento da parte del sistema immunitario di cellule infettate da virus. Gli iniziali successi nell'ambito della ricerca di base hanno portato però ad un'eccessiva fiducia nei modelli murini che sono stati in seguito utilizzati per lo studio di patologie umane e reazioni a farmaci e vaccini, con risultati deludenti. Ciò è particolarmente vero per i modelli di malattie autoimmuni (*von Herrath e Nepom, 2005*) ed immunoterapia per il cancro (*Ostrand-Rosenberg 2004*), dove tra centinaia di protocolli che avevano dato risultati promettenti sui topi soltanto pochi hanno avuto applicazioni sull'uomo. Anche per quanto riguarda i modelli di malattie neurologiche i risultati sono stati deludenti (*Schnabel, 2008*).

L'utilizzo dei modelli murini per gli studi di immunobiologia delle infezioni (ad es. malaria ed Herpes simplex) ha gravemente fuorviato i ricercatori riguardo la comprensione del controllo immunitario di questi patogeni nel corpo umano: si potrebbe ragionevolmente sostenere che l'eccessiva fiducia nei modelli murini abbia rallentato lo sviluppo di potenziali vaccini e cure per molte patologie (*Khanna e Burrows 2011*).

---

<sup>6</sup> *Inbred strain: terminologia riferita ad animali di laboratorio che si sono sviluppati attraverso accoppiamenti sequenziali fratello-sorella (ovvero tra consanguinei). Solo dopo 20 generazioni possono essere dichiarati imbred. Risultano omozigoti per circa il 98% dei loci genici, ciò consente ad es. di fare trapianti senza rigetto tra membri dello stesso ceppo inbred.*

La sfiorata tragedia del TGN1412 nel 2006 ci fornisce un esempio di ciò che potrebbe accadere quando ci affidiamo ai modelli animali allo scopo di predire le reazioni dell'uomo a farmaci e vaccini (ricordiamo che l'anticorpo monoclonale in questione era risultato del tutto innocuo, anche a dosaggi elevati, nel corso dei precedenti test su primati non umani, che sono considerati i modelli più vicini all'uomo) (*Suntharalingam et al. 2006*).

Il fatto che i risultati ottenuti sui modelli murini siano soltanto raramente applicabili all'uomo può essere spiegato da diversi fattori: primo, la maggior parte degli studi sono effettuati su ceppi *inbred*, fatto che può falsare la risposta immunitaria e secondo, uomini e topi mostrano numerose differenze sia nell'immunità innata che in quella specifica, tra cui le sottopopolazioni dei linfociti T, i recettori per le citochine, differenziazione Th1/Th2, Toll-like receptors e moltissime altre (*Mestas e Hughes 2004*).

Per cercare di ovviare a tali inconvenienti e di rendere l'animale maggiormente predittivo si è diffuso l'utilizzo di modelli murini "umanizzati" (*Legrand et al. 2009*). E' però importante far notare che per poter eventualmente utilizzare tali modelli dovremmo prima conoscere il sistema immunitario umano, in particolare dovremmo essere in grado di definire quale sia la "situazione normale".

Se un numero sufficiente di laboratori collaborasse per analizzare le migliaia di campioni di sangue raccolti quotidianamente negli Stati Uniti o nel mondo, una sorta di "Progetto Immunologia Umana", si potrebbero raccogliere velocemente ed esaminare dati provenienti da un vastissimo numero di persone sane e malate. In 5-10 anni, potremmo avere la prima approssimativa scala di riferimento della funzione immunologica (*Davis 2008*).

#### **4.4 Talidomide e test di teratogenesi su animali**

Il talidomide era un farmaco indicato contro la nausea mattutina ed un sedativo, prescritto alle donne in gravidanza alla fine degli anni '50 e all'inizio degli anni '60. Passò tristemente alla storia a causa delle gravi malformazioni agli arti (focomelia, amelia) causate nei figli delle donne che ne avevano fatto uso.

Secondo i sostenitori della sperimentazione animale, *il disastro del talidomide avrebbe potuto essere previsto ed evitato se solo fossero stati eseguiti maggiori test su animali, in particolare test di teratogenesi su animali gravidi, allora non previsti dalla legge.*

Consideriamo i dati di fatto:

Nelle donne nel primo trimestre di gravidanza è sufficiente una dose di 0,5-1 mg/Kg in una singola somministrazione per provocare gravi malformazioni al prodotto del concepimento.

Vi sono numerosi lavori in letteratura, alcuni dei quali recenti, da cui si evince chiaramente che le malformazioni indotte dal talidomide in topi, ratti e criceti si verificano raramente e soltanto a dosi estremamente elevate (da 30 a 500 volte maggiori di quelli teratogeni nell'uomo) e soltanto in determinate condizioni, ad es. induzione di carenze alimentari, deplezione di glutazione, (ratti o topi geneticamente modificati) più somministrazione giornaliera per tutto l'arco della gravidanza e nel periodo pre-concepimento, somministrazione endovenosa, ecc (Schardein 1983).

L'unica specie che più si avvicina all'uomo è la scimmia *Cynomolgus*, in cui le malformazioni agli arti si verificano anche in seguito ad un'unica somministrazione ma comunque a dosi di 20 mg/Kg, ovvero 20 volte superiori a quelle necessarie a causare lo stesso fenomeno nell'uomo.

Alcune razze di conigli si sono dimostrate relativamente sensibili all'embriopatia<sup>7</sup> da talidomide, in particolare il coniglio himalayano ed il neozelandese, a dosi comunque elevate (200-300mg/Kg) (Hoberman e collaboratori 1987).

Tali risultati derivano da test applicati soltanto dopo che gli effetti del talidomide erano stati osservati negli umani. Prima della commercializzazione del farmaco infatti, non erano probabilmente stati eseguiti test di teratogenesi sugli animali, poiché non previsti.

L'unico lavoro sugli animali reperibile in letteratura, antecedente il ritiro del farmaco e risalente al periodo in cui iniziavano a manifestarsi le malformazioni nell'uomo, è uno studio di tossicità acuta e cronica (non di teratogenesi/embriotossicità) su topi, dai risultati estremamente rassicuranti (Podolsky, e collaboratori 1999).

Considerato che all'epoca si credeva che il feto godesse di una particolare invulnerabilità grazie alla barriera feto-placentare, è verosimile credere che la mancanza di tossicità sistemica per gli animali avesse sviato l'attenzione dei ricercatori da una possibile correlazione tra talidomide ed aumento dell'incidenza delle malformazioni nei nuovi nati. Fatto che potrebbe aver contribuito ad un ritardo nel ritiro dello stesso dal mercato.

---

<sup>7</sup> Lesione dell'embrione durante le prime 8 settimane di gravidanza.



Tornando alla domanda iniziale, “il disastro avrebbe dunque potuto essere previsto ed evitato grazie ai test di teratogenesi sugli animali?”

La risposta non è scontata. Quali specie animali venivano all'epoca utilizzate nei laboratori e quale specie si sarebbe utilizzata per degli ipotetici test su animali gravidi? Verosimilmente ratti e topi, gli stessi animali utilizzati per i test di tossicità acuta e cronica (che invece furono eseguiti). Abbiamo visto che i roditori tendono ad essere resistenti all'effetto del talidomide e che per provocare degli occasionali effetti teratogeni sono necessarie delle dosi di talidomide relativamente elevate se rapportate alle MTD (massime dosi tollerate dall'adulto). Si tratta comunque di dosaggi molto lontani da quelli impiegati in regime terapeutico per l'uomo: 31 mg/Kg che è la più bassa dose di talidomide in assoluto in grado di provocare occasionali effetti teratogeni nel topo o nel coniglio (i dosaggi variano da ceppo a ceppo, da razza a razza, anche in modo significativo!) equivale per l'uomo all'assunzione di circa 30 compresse da 100 mg di talidomide al giorno, per tutta la durata del periodo dell'organogenesi, ovvero 6 settimane durante la gravidanza.

## Capitolo 5

### **Colture in vitro di cellule, tessuti, organi per ricerca, diagnosi e terapia.**

Più che in qualsiasi altro settore delle scienze, in questo campo vengono soppesate la qualità e la significatività delle tecnologie utilizzate, riferendosi da una parte a una cultura della qualità e della sicurezza dei risultati, dall'altra facendo entrare in gioco la *Good Laboratory Practice* (Buona Pratica di Laboratorio, Cooper-Hannan e coll., 1999) e la *Good Cell Culture Practice* (Buona Prassi di Coltura Cellulare Hartung et al, 2002). E' qui che cominciano a collaborare gli enti internazionali preposti alla convalida e dove i coordinatori nazionali monitorano e negoziano la revisione delle linee guida dei test.

Tutti questi elementi sono preziosi se lo scopo è creare una vera mentalità scientifica o, come sintetizza intelligentemente Kenneth G. Johnson, "il passaggio dell'uomo dall'ignoranza presuntuosa all'incertezza meditata" (*General semantics*, Kenneth G. Johnson, 1960)

Nonostante i considerevoli sforzi compiuti per sviluppare metodi alternativi all'uso di animali, sono stati fatti relativamente pochi progressi nell'accettazione di questi test da parte degli organismi preposti. L'inerzia al cambiamento è stata significativa: sia gli scienziati sia le persone preposte ai controlli tendono a usare tecniche che risultano già familiari.

#### **5.1 Colture cellulari *in vitro***

Lo studio MEIC (*Multi Evaluation of in vitro Cytotoxicity*), condotto a cavallo tra gli anni 80 e 90, venne eseguito per verificare la capacità predittiva delle colture cellulari rispetto agli animali nei test di citotossicità, sulla base di alcuni dati noti di tossicità di alcune sostanze sull'uomo. Questo studio dimostrò che una batteria di tre saggi su colture di cellule umane era maggiormente predittiva, economica e pratica degli studi condotti su animali. Questo studio dimostrò che una batteria di tre saggi su colture di cellule umane era maggiormente predittiva, economica e pratica degli studi condotti su animali. L'indice di predittività tra questa batteria di test era dell'83% rispetto ai risultati ottenuti utilizzando ratti e topi, il cui indice era del 65%.

La maggior parte dei test *in vitro* in corso di sviluppo implica colture di cellule e tessuti di origine umana o animale.

Le colture cellulari sono usate da molti decenni, e hanno rivelato una notevole utilità in studi di tossicologia, genetica, cosmetologia, oncologia, etc e, recentemente, per diagnosi e terapia (biobanche, *cell factories*).

Il corretto ed opportuno utilizzo di colture cellulari può essere un importante strumento per la definizione e caratterizzazione della tossicità di singoli composti o di miscele e consente di verificare gli effetti anche a dosi inferiori rispetto ai livelli di esposizione professionale.

Si avvalgono di metodi validati; esistono istituzioni che vigilano sulla loro efficacia e affidabilità : Centro Europeo per la Convalida dei Metodi Alternativi (ECVAM) della UE.

Le colture cellulari hanno dato un contributo straordinario allo sviluppo della biologia e della ricerca biomedica di sistemi sperimentali semplificati, hanno favorito l'approfondimento di meccanismi cellulari e molecolari ed ampliato le possibilità applicative delle nuove conoscenze.

Sono sistemi semplificati che mimano le condizioni fisiologiche e che consentono il mantenimento di cellule *in vitro*.

Le cellule coltivate *in vitro* vengono utilizzate sia per lo studio di fenomeni biologici come la crescita e il differenziamento, che per lo studio della struttura e della funzione dei geni mediante manipolazioni.

Una coltura cellulare è costituita da un gruppo di cellule eucariotiche provenienti da tessuti animali; le colture sono mantenute in vita per tempi anche molto lunghi, usando condizioni sperimentali appropriate.

Ottenere colture cellulari partendo dai tessuti di organismi superiori è un'operazione complessa, dato che tali tessuti sono eterogenei (cioè presentano tipi cellulari diversi tra loro). Generalmente i protocolli di isolamento prevedono una prima fase il cui scopo è quello di separare i diversi tipi cellulari presenti nel tessuto, demolendo la matrice extracellulare e le giunzioni intercellulari che le mantengono unite. A tale scopo il tessuto viene incubato con enzimi proteolitici (tripsina e/o collagenasi) dissociando le singole cellule mediante tecniche meccaniche. Alla fase di dissociazione segue la fase di separazione; per separare i vari tipi cellulari da una sospensione cellulare mista si può procedere in vari modi:

1. Separando le cellule in base alle loro dimensioni o al loro peso, centrifugandole a bassa velocità con l'ausilio di sostanze (es Percoll,

Ficoll o Lymphoprep) che permettono la stratificazione in gradienti a diversa densità;

2. Sfruttando la diversa attitudine dei diversi tipi cellulari ad aderire a superfici di vetro o di plastica;
3. Marcando le cellule con anticorpi coniugati con sostanze fluorescenti e poi separando le cellule marcate da quelle non marcate;
4. Utilizzando terreni di coltura selettivi che favoriscano la crescita solo di alcuni tipi cellulari e/o aggiungendo al terreno di coltura ormoni che favoriscono (o inibiscono) la crescita di determinati tipi cellulari.

La sospensione cellulare omogenea così ottenuta è messa in “coltura”, cioè viene trasferita in contenitori appositi contenenti miscele di sostanze inorganiche ed organiche necessarie al sostentamento delle cellule.

### **5.1.1 Colture Primarie**

Le cellule vengono chirurgicamente rimosse dall'organismo e poste in ambiente appropriato di coltura; esse si attaccheranno, si divideranno e cresceranno.

Addizione di enzimi di digestione (proteolitici), come la tripsina e la collagenasi, consentono il dissolvimento del tessuto connettivo che unisce le cellule all'interno dei frammenti di tessuto; si viene così a creare una sospensione di singole cellule che poste nei contenitori idonei contenenti il terreno di coltura possono aderire, crescere ed eventualmente dividersi.

### **5.1.2 Colture continue**

Le colture continue sono costituite da un singolo tipo di cellule che può essere replicato in coltura per un numero limitato di divisioni cellulari (approssimativamente 30).

### 5.1.3 Linee cellulari

Tipi di cellule in grado di propagarsi indefinitamente. Generalmente possiedono questa capacità poiché provenienti da neoplasie cliniche; la trasformazione può essere tuttavia indotta utilizzando oncogeni virali o attraverso trattamenti chimici.

Le linee cellulari trasformate presentano alcuni vantaggi quali la disponibilità illimitata, ma di contro mantengono molto poco delle caratteristiche presenti *in vivo*.

Le cellule crescono adese o in sospensione. Le cellule che crescono adese al supporto su cui sono state seminate crescono formando monostrati (se sono sane, in quanto risentono dell'inibizione da contatto) o pluristrati (se sono tumorali e quindi non risentono dell'inibizione da contatto). Le cellule in sospensione non crescono adese al supporto, ma sospese nel terreno di coltura senza aderire ad alcun supporto. Le caratteristiche delle cellule *in vitro* di solito dipendono dalla loro origine nell'animale (*in vivo*). Ad esempio, quasi tutte le cellule in sospensione derivano dalle cellule del sistema immunitario o dai loro precursori; *in vivo*, esse circolano nel torrente sanguigno e non tendono certo ad attaccarsi ad un substrato (ad es. i linfociti T e B). Le cellule aderenti derivano invece da muscoli, fegato, sistema nervoso, rene.

### 5.1.4 I terreni di coltura

Perché le cellule crescano *in vitro* è necessario che l'ambiente sia il più vicino possibile a quello in cui le cellule si ritrovano *in vivo*. Fattori fondamentali sono quindi la temperatura, il substrato su cui le cellule sono fatte crescere e il terreno in cui vengono mantenute.

La formulazione completa del terreno che permette la crescita delle cellule di mammifero può sembrare piuttosto complessa, ma si può dire che i terreni sono fundamentalmente formati da una soluzione isotonica e tamponata che contiene sali inorganici, una fonte energetica come ad esempio il glucosio, gli aminoacidi essenziali (i mammiferi non sono in grado di sintetizzarsi tutti) e altre sostanze, tra cui la più importante è il siero.

Il terreno di coltura viene scelto in base alle caratteristiche e alle esigenze del tipo cellulare utilizzato. Può essere liquido (pronto all'uso) oppure in polvere (in tal caso deve essere ricostituito come indicato dalla casa produttrice). In ogni caso il terreno di coltura deve avere le seguenti caratteristiche: deve avere determinati valori di pH (7.4) e osmolarità (300mOsm/l); deve essere non tossico; deve contenere tutti i composti necessari al

metabolismo cellulare, e precisamente:

1. Ioni, per mantenere il bilancio osmotico;
2. Zuccheri, come fonte di energia;
3. Amminoacidi, per la formazione di proteine;
4. Vitamine, cofattori enzimatici.

Il terreno di coltura può contenere anche Rosso Fenolo, quale indicatore di pH. Prima dell'uso al terreno di coltura vengono aggiunti una miscela di antibiotici (di solito penicillina/streptomicina) e un antimicotico (generalmente anfotericina B).

### **5.1.5 Tipi di terreno e supplementi.**

Il primo terreno a composizione definita e' stato il BME o Eagle's Basal Medium.

E' usato comunemente per cellule adese (o in monostrato) come ad es. le cellule HeLa e alcune cellule primarie. Altri terreni sono stati sviluppati a partire da questo, come ad esempio il DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), che prevede una maggiore quantità di vitamine e aminoacidi rispetto al BME, e venne inizialmente usato per cellule embrionali di topo. Oggi è un terreno tra i più utilizzati, specialmente per cellule adese.

Per le colture di cellule aderenti di solito si utilizzano terreni con un contenuto relativamente alto di  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$ , che sono necessari per le proteine di adesione. Le cellule in sospensione di solito non richiedono queste stesse alte concentrazioni, e si utilizzano quindi terreni più "poveri" di questi cationi come ad es. l'RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium), che è comunemente usato per le cellule della linea bianca del sangue sia umane che murine, sia normali che trasformate. Comunque l'RPMI è, insieme al DMEM, uno dei terreni più utilizzati, anche per cellule adese.

Una volta preparato (o acquistato) il terreno "base", vi si dovranno aggiungere alcuni elementi prima di poterlo utilizzare per le colture.

L-glutamina (L-glu): Supplementata all'1%, la glutamina e' una delle fonti principali di carbonio per molte cellule in coltura; non solo fornisce precursori per le biosintesi e per la sintesi proteica, ma, insieme al glucosio e al piruvato, è una fonte energetica attraverso il ciclo di Krebs. E' assolutamente necessaria alla crescita cellulare, ma non è stabile: a 4°C si degrada completamente in 4 settimane. Viene venduta già pronta, sterile come

soluzione 200 mM. Vi sono oggi dei terreni in commercio in cui la glutamina viene stabilizzata, solitamente fornendola sotto forma di un tripeptide.

Antibiotici: molti operatori li usano di routine, specialmente penicillina, streptomina e gentamicina. Questa è in realtà una procedura sbagliata, non solo perché gli antibiotici possono interferire con le nostre cellule, ma anche perché rischiamo di selezionare dei ceppi batterici antibiotico-resistenti. E' buona norma utilizzarli ogni tanto, oppure nel caso ci sia la possibilità di una contaminazione nelle vicinanze, o che si trasportino le cellule.

Siero: il siero animale è un componente fondamentale dei mezzi di coltura, anche se poco definito. In realtà è una miscela di composti essenziali per la crescita cellulare, dato che contiene componenti che promuovono l'adesione e la propagazione cellulare, nutrienti e minerali in tracce (oligoelementi), proteine di trasporto come transferrina e albumina, fattori di crescita e ormoni, proteine (come l'albumina) capaci di agire in modo non specifico nel legare sostanze tossiche e stabilizzare componenti instabili.

Il siero più utilizzato è quello bovino, specialmente quello fetale (*FCS o Fetal Calf Serum, FBS o Fetal Bovine Serum*).

Nella maggior parte dei casi i terreni vengono supplementati con un 10% di FCS.

Di solito il siero viene inattivato al calore (30 minuti a 56°C) per distruggere le molecole del complemento e le immunoglobuline che possono essere presenti. La cascata di reazioni del complemento porta alla lisi cellulare, e quindi alla morte della coltura.

### **5.1.6 Siero Fetale**

Il problema principale legato all'utilizzo del siero animale è rappresentato dal fatto che la sua composizione non è costante, ma varia da lotto a lotto, principalmente per il fatto che deriva da animali diversi. Tuttavia, la partita successiva non potrà mai essere identica alla precedente, e potremo avere variazioni anche notevoli nella crescita, nella proliferazione o nel differenziamento delle cellule. Inoltre nel siero possono essere presenti fattori sconosciuti che possono avere un effetto negativo sugli esperimenti.

I componenti del siero, essenziali per la crescita cellulare di alcune linee cellulari, sono stati analizzati e identificati, e questo ha permesso di mettere a punto terreni "chimicamente definiti" che contengono alcuni dei costituenti del siero in quantità note, eliminando questi

problemi. Tuttavia molte sostanze presenti nel siero, come i fattori di crescita e gli ormoni, se acquistati purificati, possono avere dei costi molto elevati e questo fa sì che i terreni addizionati di siero rimangano ancora molto diffusi.

L'utilizzo di siero animale comporta una serie di aspetti controversi:

- non riproducibilità da lotto a lotto - rischio di contaminazione.
- aspetti etici relativi al prelievo e alla produzione del prodotto.

I componenti del siero essenziali per la crescita cellulare per alcune linee cellulari come precedentemente detto, sono stati analizzati ed identificati. Questo ha permesso di mettere a punto terreni “chimicamente definiti” o “serum free” che contengono alcuni dei costituenti del siero in quantità note.

I terreni senza siero (*serum-free media*) stanno diventando sempre più diffusi, specialmente per applicazioni particolari, come ad es. nella coltura di cellule staminali. Uno dei terreni più utilizzati come base è l'ISCOVE'S, che è una modificazione del DMEM a cui sono aggiunti altri componenti come albumina sierica bovina, transferrina e lipidi della soia.

L'utilizzo di questi terreni richiede, per molti tipi di cellule, l'aggiunta di ulteriori sostanze che spesso non sono completamente chiarite: un certo tipo di cellula può crescere in un terreno privo di siero, ma alcune sue caratteristiche (ad esempio l'efficienza a formare colonie) possono risultare modificate. I kit di fattori di sostituzione del siero, che contengono molti dei composti attivi presenti nel siero, possono essere utili nel superare questi problemi.

I terreni privi di siero sono spesso utilizzati per ottenere la crescita selettiva di alcuni tipi cellulari rispetto ad altri, essi stanno avendo uno sviluppo importante, molte aziende hanno focalizzato l'attenzione su questo campo, investendo molto nella ricerca e nello sviluppo di nuovi prodotti specifici.

Ogni tipo cellulare è caratterizzato da aspetti fisiologici e metabolici peculiari; questo ha condotto allo sviluppo di specifici terreni e kit di supplementazione.

### **5.1.7 I Supporti**

I supporti dove solitamente vengono coltivate le cellule sono le fiasche e le piastre (petri o



multipozzetto).

Questi sono solitamente prodotti con un polimero plastico chiamato polistirene che per caratteristiche chimico-fisiche rappresenta il materiale ideale.

La plastica subisce un trattamento al plasma (es. ossigeno attivato) per caricare negativamente la superficie e renderla idrofila. Questo permette di aumentare il potere legante ed ottimizza l'adesione della cellula al supporto con la formazione di legami chimici deboli (es. ponti H) tra cellula e polimero.

### **5.1.8 Controllo della temperatura e della CO<sub>2</sub>**

L'ambiente fisico necessario alla crescita *in vitro* viene fornito dagli incubatori, strumenti capaci di mantenere temperatura e atmosfera controllate. Le cellule coltivate *in vitro* richiedono un controllo di temperatura rigoroso almeno quanto quello dell'organismo vivente; cellule di mammifero vengono comunemente coltivate a 37°C, mentre per altri tipi cellulari, come ad esempio cellule di drosophila, l'incubatore deve poter essere regolato a temperature diverse come 30°C o 34°C.

La pressione parziale di CO<sub>2</sub> adatta alla coltura *in vitro* di cellule animali deve essere vicina a quella misurata all'interno dei tessuti (35-45 mmHg, pari al 4.6- 5.9% di CO<sub>2</sub>), per questo motivo l'atmosfera all'interno degli incubatori è costituita al 95% da aria e al 5% da CO<sub>2</sub>.

## **5.2 Vantaggi e limiti nell'uso delle colture cellulari**

Uno dei vantaggi più rilevanti nell'uso delle colture cellulari è relativo alla possibilità di studiare effetti tossici su cellule umane, ovviamente impossibile *in vivo*. Inoltre, le colture cellulari sono poco costose, forniscono risultati in tempi brevi, possono essere esposte direttamente alle sostanze da saggiare, possono rispondere anche a concentrazioni molto basse, poiché le sostanze nel mezzo di coltura sono a contatto diretto con le cellule. Invece, un limite notevole riguarda la diversa organizzazione tra un sistema sperimentale costituito da cellule isolate tra loro non comunicanti, e la complessa organizzazione di un organismo nella sua interezza e complessità funzionale e strutturale. Inoltre, si verifica la perdita di componenti (soprattutto quelli del sistema nervoso ed endocrino) coinvolti nella regolazione

omeostatica *in vivo*. Si presentano anche alterazioni metaboliche, caduta di livelli enzimatici, variazione di cicli metabolici, selezione delle cellule più attivamente proliferanti. Particolare non trascurabile infine, che può costituire a seconda dei casi un vantaggio o uno svantaggio, è la preparazione e l'esperienza dell'operatore; le colture cellulari necessitano infatti di sterilità assoluta, in quanto una contaminazione da batteri, muffe o lieviti conduce alla perdita della coltura stessa. Un altro problema delle colture cellulari può riguardare l'aneuploidia di molte linee stabilizzate, che possono presentare corredo cromosomico diverso dalle cellule di origine.

In ogni caso, è innegabile che le colture cellulari sono forse il modello biologico più promettente, a dispetto di caratteristiche e limiti intrinseci che vanno ben calibrati nella pianificazione di esperimenti e nell'interpretazione dei risultati.

### **5.3 Nuove frontiere nei saggi cellulari: *strutture tissutali tridimensionali in vitro e sistemi microfluidici***

Le linee cellulari, che crescono in aderenza, per poter proliferare necessitano di una superficie a cui potersi "ancorare". *In vitro* almeno il 50% delle cellule è in contatto con la plastica e con il terreno di coltura, mentre ciò ovviamente non accade *in vivo*. Anche la morfologia cellulare è differente, *in vivo* la cellula ha una forma tridimensionale mentre *in vitro* è appiattita.

Le interazioni cellula-cellula saranno differenti, *in vitro* hanno la possibilità di interagire solo lateralmente mentre *in vivo* la loro capacità di interagire spazia in tutte le dimensioni.

Utilizzando determinati *scaffold* di polistirene è possibile coltivare *in vitro* le cellule andando a formare strutture 3D molto simili alle strutture *in vivo*.

Gli *scaffold* di polistirene sono delle strutture dello spessore di membrana di circa 200  $\mu\text{m}$ , hanno una porosità  $> 90\%$ , ciò facilita alle cellule e al terreno il passaggio attraverso la stessa mimando, in questo modo, un tessuto *in vivo* e forniscono un'impalcatura sopra la quale le cellule possono crescere e interagire tra di loro in maniera tridimensionale.

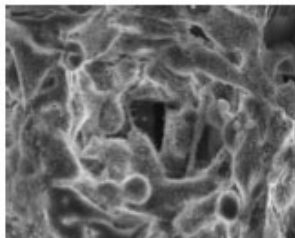
Non essendo richiesta la diffusione delle cellule sulla superficie di crescita, lo *scaffold 3D* facilita l'adesione cellulare e la proliferazione senza causare stress alle cellule.

Inoltre ciò facilita le interazioni cellula-cellula e le attività metaboliche avvengono come se fossero nel loro micro-ambiente. La membrana è sottile ed uniforme, coperta con il collagene, e ciò favorisce l'attacco delle cellule alla superficie e promuove la crescita cellulare.

Le applicazioni sono molteplici, possiamo studiare la struttura cellulare e derivarne la funzione, fare dei saggi *in vitro* in un ambiente tridimensionale, valutare il fenomeno di invasione tumorale o la migrazione tumorale, crescere e differenziare cellule staminali trattate con particolari stimoli o ancora creare organizzazioni tissutali molto simili a quelle *in vivo*.

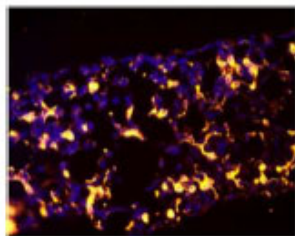
Un esempio è dato dalla vitalità cellulare e funzioni metaboliche degli epatociti.

### *Struttura e funzione delle cellule*



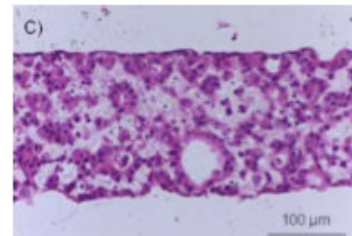
epatociti del fegato

### *Crescita e differenziazione cellulare*



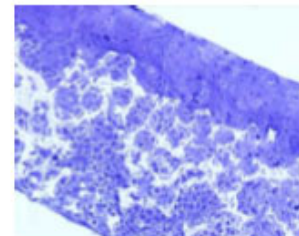
cellule staminali

### *Saggi in vitro*



cellule cancerose

### *Sviluppo e organizzazione tissutale*



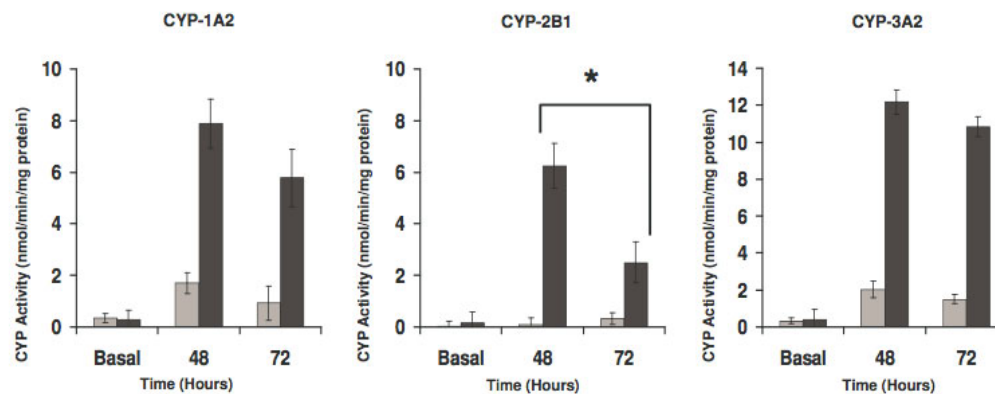
cellule della pelle

**Figura 1.** *Scaffold* 3D (Sarra Ferraris)

Nella figura 1, a sinistra vi è un'immagine confocale di queste cellule. In alto si osserva una coltura 2D mentre in basso si può notare la loro organizzazione quando crescono in uno *scaffold* in 3D, quando le cellule crescono in 3D formano anche canalicoli, tipici della crescita *in vivo*.

Gli epatociti sono la linea cellulare per eccellenza quando si fanno studi di tossicologia dei farmaci, in 3D risultano molto più vitali rispetto alla controparte in 2D.

Osservando l'attività enzimatica, per esempio la citocromo ossidasi che è l'attività principe per la detossificazione dei farmaci, possiamo vedere che le cellule sono più metabolicamente attive in un ambiente in 3D.



**Figura 2.** Espressione di Cyp p450 in epatociti primari di ratto, coltivati per 3 giorni in colture 2D (grigio) e in colture 3D (nero). Le cellule sono state indotte ad esprimere il citocromo P450 usando un cocktail di tossine modello. (Sarraf Ferraris)

Quindi anche in questo caso il loro metabolismo è accelerato e stimolato da un organizzazione in 3D e quindi con delle interazioni cellula-cellula molto simili a quelle che si verificano *in vivo*.

### 5.3.1 Studio su cellule del cancro alla mammella in un ambiente 3D

Lo studio è stato effettuato in collaborazione con l'Università di Roma 'La Sapienza' e in stretta collaborazione con il gruppo di ricerca, coordinato da Mina J Bissell, *Distinguished Scientist del Lawrence Berkeley National Lab, USA*. Nel Laboratorio a Berkeley è stato messo a punto un modello unico di cellule mammarie umane che ricapitola le varie fasi della trasformazione da cellula normale a cellula tumorale invasiva, cresciute in tre dimensioni, in una matrice extracellulare che mima il microambiente in cui il tumore si sviluppa. E' stato creato un modello in cui le cellule continuino a comunicare non solo tra di loro, ma anche con la matrice che di solito le circonda nel tessuto in cui il tumore prende origine. Grazie anche agli esperimenti condotti in questo modello, i ricercatori, sono riusciti a dimostrare che il gene hMENA, che non è espresso nelle cellule normali, è presente nel corso della

trasformazione da cellula normale a cellula tumorale e produce diverse forme proteiche durante la progressione del carcinoma della mammella, utilizzando lo *splicing alternativo*<sup>8</sup>. “Il ruolo di questo processo nella formazione e progressione dei tumori è stato sottovalutato negli ultimi anni perché le tecnologie utilizzate per studiare le alterazioni di espressione genica dei tumori non consideravano questo ulteriore livello di complessità”<sup>9</sup>. Nel lavoro pubblicato su PNAS, i ricercatori hanno anche dimostrato come intervenendo su un'altra proteina che regola il processo di *splicing*, sia possibile riprogrammare il gene di hMENA a produrre un forma proteica che ha un ruolo anti invasivo e che gli stessi ricercatori avevano descritto precedentemente.

### 5.3.2 Saggi cellulari dinamici

I saggi cellulari dinamici sono saggi di adesione e migrazione cellulare dove le cellule non sono coltivate in un ambiente statico ma in un ambiente altamente dinamico.

Nei saggi dinamici si possono mimare le condizioni fisiologiche attraverso cui il fenomeno si verifica *in vivo*. Si possono effettuare attraverso la tecnologia delle Flow cells o attraverso tecnologie microfluidiche sfruttando pertanto dei canali microfluidici all'interno dei quali le cellule vengono coltivate e fatte interagire in ambienti dinamici.

Questi saggi vengono anche chiamati saggi di *shear stress* (flusso di taglio), che mima quello che *in vivo* è il flusso sanguigno, simulando molto bene ciò che accade all'interno dei vasi sanguigni, pertanto sono molto utili se si vogliono studiare fenomeni di adesione, di tras migrazione o ancora di invasione tumorale.

Ciò ci permette una manipolazione di fluidi su scala micrometrica.

I dispositivi microfluidici portano notevoli vantaggi legati ai piccoli volumi in gioco; ad esempio nel campo delle analisi biochimiche, garantiscono un'elevata efficienza pur richiedendo modiche quantità di campioni e reagenti. In aggiunta la microfluidica si sta pian piano rivelando uno strumento fondamentale per l'analisi non solo di composti relativamente semplici, quali proteine e DNA, ma anche di sistemi biologicamente più complessi, quali cellule e tessuti. Il concetto di “*cells on chips*” è interessante soprattutto dal punto di vista

---

<sup>8</sup> Lo *splicing* alternativo è un meccanismo altamente complesso che consente di produrre molteplici varianti di una stessa proteina, con funzioni anche opposte, a partire dallo stesso gene.

<sup>9</sup> Spiega Francesca Di Modugno.

della meccanica cellulare, in quanto i dispositivi microfluidici di per sé offrono la possibilità di garantire un ambiente tridimensionale controllato simile a quello presente *in vivo*. In questo modo viene data la possibilità di studiare il comportamento delle cellule in condizioni pressoché fisiologiche, con il minimo spreco in termini di numero di cellule richieste e di costosi reagenti.

## Capitolo 6

### Metodi sostitutivi

Negli anni 1989-1996, circa 50 laboratori nel mondo hanno testato, sviluppato e valutato più di 150 nuove metodologie specifiche per l'analisi della tossicità delle sostanze chimiche.

Per semplicità, i metodi sostitutivi all'uso di animali sono stati qui suddivisi in tre gruppi: i metodi chimici, i metodi biologici e i metodi matematici-informatici.

#### 6.1 Metodi chimici

##### 6.1.1 Corrosione cutanea Corrositex™ assay

Nella *Guideline for the testing of chemicals OECD 404 Acute dermal irritation/corrosion*, del 2002, si afferma che: « [...] speciale attenzione è stata rivolta a possibili miglioramenti del benessere degli animali ed alla valutazione di tutte le informazioni esistenti sulle sostanze da testare, per evitare l'uso non necessario di animali in laboratorio [...] - tutte le informazioni riguardanti una sostanza e il suo potenziale irritante-corrosivo devono essere valutate prima di considerare un test *in vivo* [...] - informazioni sufficienti possono già esistere per la classificazione di una sostanza come del suo potenziale irritante o corrosivo, senza il bisogno di svolgere test sugli animali».

Per irritazione si intende un danno di entità variabile, ma di natura reversibile, che si verifica dopo l'esposizione ad una sostanza. Ha un'insorgenza localizzata e può manifestarsi con reazioni infiammatorie e segnali clinici evidenti, come eritemi o rossori.

Per tali motivi possono essere utilizzati per test di irritazione cutanea *in vitro* modelli validati, con il vantaggio di un modello riproducibile standard.

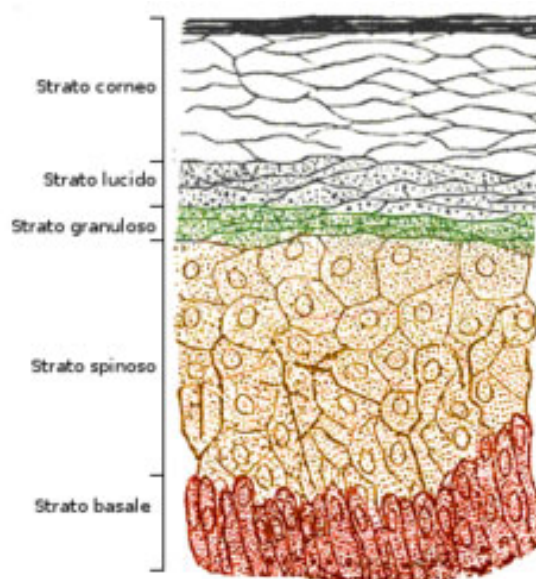
Il metodo sostituisce il Draize rabbit skin test, ossia il test di irritabilità della pelle, molto utilizzato nella cosmesi, per il quale fino ad ora venivano utilizzati conigli albini.

Per eseguire questo test, venivano utilizzati 8 conigli albini per ogni prova. Si sceglieva la zona da trattare, si asportava il pelo e sulla superficie tosata, venivano applicati dei tamponi di garza. Al centro di ogni tampone veniva applicata la sostanza in esame e dopo 24 e 72 ore venivano osservati i punti di applicazione. Si valutava l'arrossamento della cute, l'edema

ossia il rigonfiamento della cute e la necrosi, la morte non programmata di cellule e tessuti viventi.

Il test alternativo, è valido per specifiche classi di sostanze chimiche (es. basi organiche e acidi inorganici), usato in United Nations Department of Transportation packing groups approvato da ECVAM ma con delle limitazioni. Se il test è negativo viene eseguito su modelli 3D.

Si utilizza un modello tridimensionale di pelle umana ricostituita. La struttura deve essere creata da cheratinociti umani e devono essere presenti tutti gli strati caratterizzanti l'epitelio: lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso e lo strato corneo (figura 3).



**Figura 3** Schema base dell'epidermide.

E' necessario rilevare che i parametri di tossicità che si prendono in considerazione differiscono perché, nel caso di studi di screening, è importante avere dati utilizzabili in tempi brevi e con uso limitato di tempo e risorse, mentre nel caso di meccanismi metabolici o molecolari servono dati precisi, tecniche specifiche e laboriose. Nel primo caso si cercano indicatori sensibili, anche se non troppo specifici, che possano essere rilevati con metodi semplici, nel secondo invece, si cercano segnali specifici.

Per rilevare la vitalità cellulare, terminato il tempo d'esposizione, e valutare quindi i danni riportati dal tessuto, si usano diversi tipi di saggio che in linea di massima contano la capacità di espellere o trattenere coloranti. Il saggio di esclusione di coloranti si basa sulla misura di permeabilità della membrana cellulare, partendo dal presupposto che solo le cellule



danneggiate consentono il passaggio di molecole voluminose.

Il colorante è aggiunto direttamente al terreno di coltura e l'osservazione è fatta in tempi brevi. Il limite più evidente è che i danni causati da un agente citotossico in genere sono interni o richiedono un certo tempo per esprimersi, quindi il danno della membrana non è subito evidente e si può avere una sottostima del danno stesso.

Il saggio di accumulo di coloranti, invece, prevede la misurazione della perdita di coloranti vitali. Anche in questo caso si ha un'aggiunta di colorante al terreno di coltura, ma l'osservazione può richiedere un tempo mediamente lungo (un paio d'ore). Terminata l'operazione, viene recuperata la soluzione contenente il colorante e letta con uno spettrofotometro.

In ogni caso, i metodi che fanno uso di coloranti sono soggetti alle variazioni quantitative del colorante nelle soluzioni usate e quindi i risultati ottenuti possono non essere confrontabili con i valori assoluti.

### **6.1.2 Solatex-PI**

La foto-irritazione è uno degli effetti tossici che si possono verificare quando una sostanza chimica, assorbendo i raggi ultravioletti della luce, danneggia la pelle. Il test SOLATEX-PI permette lo studio della capacità di creare foto-irritazione di queste sostanze.

Gli effetti tossici di foto-irritazione avvengono quando la luce interagisce con la sostanza creando una serie di reazioni chimiche (reazioni di ossidoriduzione, formazione di radicali liberi e successiva interazione con la pelle).

Il sistema SOLATEX-PI utilizza una speciale membrana e una serie di composti chimici che possono reagire e "indicare" se stanno avvenendo le reazioni pericolose.

## **6.2 Metodi biologici**

### **6.2.1 Test di Ames**

Il fondamento scientifico che ha permesso la creazione, e i successivi miglioramenti, di questo test è la capacità di molti carcinogeni di generare centri elettrofili che si legano al DNA cellulare. In pratica, per sapere se una sostanza è potenzialmente cancerogena o

teratogena (se può dare, cioè, azione mutagenica), viene messa a contatto con ceppi di batteri (*Salmonella typhimurium*) in un apposito terreno di coltura. Viene usata una varietà del batterio appositamente modificata che, per crescere, non ha bisogno di una particolare molecola, l'Istidina. Se la sostanza testata è mutagenica modifica il batterio e gli ricrea il bisogno di istidina.

### **6.2.2 Test di Bettero**

Questo test viene utilizzato per testare sostanze potenzialmente irritanti per l'occhio. La prova viene eseguita sulla lacrima umana che, in condizioni normali, contiene mediatori chimici (Istamina, Serotonina, Leucotrene 4, ecc...) dell'infiammazione solo in piccole quantità. La sostanza in esame viene posta a contatto con la lacrima umana: se la sostanza è un irritante di qualsiasi genere il numero di mediatori chimici aumenta rapidamente. In questo modo si può determinare con estrema facilità e precisione la forza irritante di una sostanza.

### **6.2.3 Microtox**

Il sistema per la rilevazione della tossicità Microtox è stato messo a punto negli USA alla fine degli anni '70 ed è da tempo diventato una valida alternativa ai test convenzionali con pesci ed invertebrati, quale strumento di screening per il controllo della qualità di campioni liquidi.

Il test Microtox utilizza come organismo indicatore il *Vibrio fisheri* (Eubacteria, Vibrionacea; già commercializzato come *Photobacterium phosphoreum*), un batterio marino bioluminescente Gram negativo, aerobio-anaerobio facoltativo.

Questo batterio è stato isolato nelle acque di mare, dalle pareti e dai contenuti intestinali di animali marini e dagli organi luminosi specializzati di alcuni pesci e presenta un ampio range di tolleranza alla salinità.

La caratteristica che viene sfruttata nei test di tossicità è la sua bioluminescenza. Il *Vibrio fisheri*, infatti, può emettere luce di colore blu-verde con una lunghezza d'onda massima pari a 430 nm, purché sia presente ossigeno. La sequenza di reazioni che provoca l'emissione di luce è associata alla catena respiratoria di trasporto degli elettroni ed è catalizzata dall'enzima luciferasi (ossigenasi a funzione mista connessa alla membrana cellulare) per ossidare simultaneamente la luciferina (un'aldeide ciclica contenente più di otto atomi di carbonio) e la riboflavina 5-fosfato.

La reazione di produzione della luce è la seguente:



dalla reazione tra luciferasi e il coenzima flavina, assieme con l'ossigeno e la luciferina, si forma un complesso attivato che si degrada ed emette protoni responsabili della bioluminescenza. Per un meccanismo d'azione ancora non del tutto chiaro, quando i batteri vengono a contatto con sostanze tossiche, si ha un abbassamento misurabile quantitativamente della luminescenza.

Probabilmente le sostanze tossiche provocano l'inibizione di qualche enzima o intervengono nei processi di trasporto della membrana, portando ad un rallentamento delle reazioni di produzione di energia della cellula e quindi una riduzione dell'emissione di bioluminescenza. Tuttavia la natura diversa delle sostanze che determinano una diminuzione della luce fa pensare ad una molteplicità di siti d'azione dei tossici sui batteri, nell'ambito comunque della membrana cellulare e della catena di trasporto degli elettroni.

#### Caratteristiche del test Microtox

Il sistema per la rilevazione della tossicità Microtox utilizza come reattivo biologico il *Vibrio fischeri*, ottenuto da John Lee presso il Naval Ocean System Center, San Diego, CA. I batteri utilizzati nel test sono liofilizzati, surgelati, e conservati alla temperatura di  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ; quando serve la coltura viene reidratata ottenendo così una sospensione di microorganismi pronta per l'uso. Questa viene esposta per uno o più intervalli di tempo, a seconda della cinetica d'azione delle sostanze tossiche, a diverse diluizioni del campione da saggiare; la quantità di luce emessa, opportunamente corretta per la diminuzione di luce che si verifica fisiologicamente in assenza di tossicità, è proporzionale all'effetto causato nel batterio.

La lettura della bioluminescenza avviene tramite fotometro termostato a  $15\text{ }^\circ\text{C}$  munito di un tubo fotomoltiplicatore. L'analizzatore è interfacciato da un computer dotato di software per l'elaborazione statistica dei dati.

Si ottiene quindi una curva concentrazione-risposta da cui si può ricavare il valore di  $\text{EC}_{50}^{10}$ , ossia la concentrazione del campione che determina una diminuzione del 50% della luce emessa.

---

<sup>10</sup> Concentrazione di un dato farmaco tale da produrre il 50% dell'effetto massimale.

### Sensibilità e confronto con altri test

Il test Microtox, grazie al suo ampio spettro di sensibilità a diversi composti sia organici che inorganici, è stato ampiamente utilizzato come strumento di screening atto ad accertare la tossicità di campioni di svariata natura: effluenti di scarico domestici ed industriali, acque di fiumi, sedimenti e suoli.

Negli ultimi anni inoltre ha trovato una larga diffusione nell'ambito del trattamento dei rifiuti pericolosi. Il test Microtox, infatti, è consigliato dall'EPA per valutare l'impatto di questi sull'attività microbica del suolo e per stimare la quantità di materiale da smaltire a terra senza provocare l'inibizione della degradazione.

#### **6.2.4 Colture di epatociti**

Questa metodologia è particolarmente importante perché gran parte delle trasformazioni chimiche che una sostanza subisce quando entra in contatto con un organismo avviene, nell'uomo, proprio nel fegato. Gli epatociti (colture di cellule di fegato umano) possono essere usati, in farmacologia e in tossicologia, per diversi studi. I principali sono i seguenti:  
Studi di biotrasformazione - Per studiare le modifiche che una sostanza chimica subisce all'interno dell'organismo e i metaboliti che si formano.

Studi tossicologici - Per valutare la tossicità sia della sostanza sia delle sue trasformazioni all'interno dell'organismo.

Studi meccanicistici - Epatociti isolati offrono la possibilità di studiare, in dettaglio, i meccanismi con cui avvengono le azioni biologiche.

Studi biocinetici - gli epatociti sono un insostituibile metodo per studiare il trasporto delle sostanze a livello cellulare.

### **6.2.5 Lattato Deidrogenasi (LDH)**

L'enzima LDH può essere usato come indicatore della distruzione della membrana cellulare. Gli effetti di sostanze chimiche a contatto con colture cellulari o tissutali si possono valutare misurando la quantità di LDH nell'ambiente di reazione. Più la sostanza chimica distrugge le membrane cellulari, maggiore sarà la quantità di LDH rilasciata nell'ambiente di reazione.

### **6.2.6 Test di captazione del Rosso Neutro (NRU)**

Il test di citotossicità dell'incorporazione del Rosso Neutro (NRU, *neutral red uptake*) permette di valutare la sopravvivenza/vitalità cellulare partendo dal presupposto che le cellule vitali possono incorporare e legare il NRU, un colorante vitale. L'NRU è un colorante debolmente cationico che può rapidamente penetrare nelle cellule per diffusione non ionica, accumulandosi nei lisosomi dove si lega a siti anionici della matrice. Perturbazioni alla membrana cellulare o lisosomiale determinano fragilità dell'apparato lisosomiale e variazioni gradualmente irreversibili. Ne consegue una diminuita captazione e legame dell'NRU. Ciò permette di distinguere tra cellule vitali, danneggiate o morte. Il test si applica in caso di valutazione del potenziale citotossico di stimoli patogeni su colture cellulari.

*Sulle stesse colture, al termine della lettura spettrofotometrica dell'NRU è possibile effettuare il dosaggio proteico.*

Si basa sull'accumulo nei lisosomi citoplasmatici del colorante rosso neutro. Il sequestro ed immagazzinamento del colorante è un processo attivo, quindi la quantità di colorante accumulato è proporzionale al numero di cellule vive presenti. Le cellule sane o meno danneggiate conterranno una maggiore quantità di colorante, quindi dall'estrazione del rosso neutro catturato dai lisosomi si ottiene un liquido di cessione la cui densità ottica è proporzionale al numero di cellule vive presenti. Questo test, grazie anche all'opportunità di acquisire immagini, fornisce importanti informazioni e consente dunque di fare una fine valutazione dei livelli di sofferenza cellulare e del potenziale citotossico delle sostanze testate. (Test colorimetrico)

### **6.2.7 Test di rilascio del Rosso Neutro (NRR)**

L'NRR è un test di citotossicità in grado di misurare il danno causato da una sostanza chimica alla membrana cellulare. Le cellule trattate precedentemente con il colorante NR vengono esposte ad alte dosi della sostanza in esame per brevi periodi di tempo. Se la membrana cellulare viene attaccata e distrutta rilascia il colorante nell'ambiente di reazione.

### **6.2.8 Test di contenuto totale delle proteine (TPC)**

Il più famoso dei test citotossicologici usato per identificare l'inibizione della crescita cellulare è probabilmente il TPC: con questo metodo una sostanza chimica viene posta a contatto con una coltura di cellule in crescita esponenziale e viene successivamente misurato il contenuto totale di proteine.

### **6.2.9 MTT Test: Test di riduzione dei sali di tetrazolio**

Il saggio MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] è basato sulla capacità di una deidrogenasi mitocondriale, funzionale solo in cellule vitali, di trasformare l'MTT (colore giallo pallido) in cristalli di formazano (blu scuro) che sono impermeabili alle membrane cellulari, per cui si accumulano all'interno delle cellule vitali. L'aggiunta di un detergente solubilizza le membrane e libera i cristalli anch'essi solubilizzati. Il numero di cellule vive è direttamente proporzionale ai livelli di formazano prodotto, valutato con lettura colorimetrica, in piastre *multiwell*, con lettore spettrofotometrico.

Si applica in caso di esperimenti su colture cellulari.

Il test dell'MTT si esegue su un campione di cellule per saggiarne la vitalità.

L'MTT è formato da anelli di tetrazolio. Il test si basa sul fatto che la cellula viva, contiene l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (SDH) capace di scindere gli anelli dell'MTT con conseguente formazione di cristalli di formazano, di un caratteristico colore blu.

Le cellule morte non hanno la capacità di far avvenire la reazione di scissione diversamente da quelle vive. Mediante uno spettrofotometro ( $\lambda=570\text{nm}$ ) si ottiene una densità ottica o assorbanza, la quale permette di identificare il quantitativo di cellule vitali presenti nella coltura.

La spettrofotometria si basa sulla possibilità di misurare la concentrazione della sostanza in esame tramite l'intensità di colore assunto dal preparato esaminato.

Lo spettrofotometro esegue il calcolo dell'assorbanza sfruttando i principi della legge di Labert Beer che presuppone tre condizioni:

- uso di radiazioni monocromatiche;
- soluzioni in esame, limpide;
- assorbanze con valore uguale a 1 non sono valide;

#### **6.2.10 Inibizione del legame delle cellule tumorali (ITC)**

Il test ITC ha dimostrato di essere in grado di identificare sostanze potenzialmente teratogene; infatti, in presenza di queste sostanze, risulta inibito il legame di cellule tumorali ad una superficie di plastica trattata con Concanavalina A. Con questo saggio è inoltre possibile valutare se il danno, che la sostanza in esame può causare, riguarda la struttura della membrana oppure le sue funzioni.

### **6.3 Metodi matematico-informatici**

- **Epidemiologia:** è la scienza che studia la frequenza e la distribuzione dei fenomeni epidemici, e quindi delle malattie, nella popolazione. Sono studi che vengono effettuati selezionando due gruppi di persone che sono il più simili possibili tra di loro ma differiscono per una singola caratteristica: ciò che si vuole studiare è l'effetto di questa singola caratteristica sulla popolazione (es. il fumo di sigaretta, l'alcool, una particolare terapia, la vicinanza di una fonte inquinante, caratteristiche genetiche, ecc.). Lo sviluppo delle analisi statistiche permette di mettere in relazione la caratteristica in esame con il formarsi di particolari patologie (tumori, allergie, ecc.).
- L'epidemiologia non è solo un metodo alternativo ma è il principale metodo di ricerca medico scientifica esistente.

- **Metodi in-silico:** fra di essi le metodologie chemiometriche e la modellistica QSAR rivestono un ruolo molto importante, e possono essere concretamente usate per ridurre l'utilizzo di animali secondo il paradigma 3R (Ridurre, Raffinare, Rimpiazzare).
- I metodi in silico si sono sviluppati come nuovo procedimento per esaminare le sostanze chimiche basandosi sulla simulazione al computer o su modelli. I risultati delle prove esistenti servono per definire i criteri e i modi con cui una sostanza potrebbe essere pericolosa nell'organismo e nell'ambiente.
- In tale maniera, la tossicità di una particolare sostanza chimica impiegata in un ambiente specifico può essere predetta e valutata senza ulteriori sperimentazioni su animali.
- I metodi in silico sono ampiamente utilizzati come strumento di *screening* e di identificazione per test prioritari in laboratorio. Essi sono utilizzati anche congiuntamente ai dati di laboratorio per aggiungere un'altra linea di prove o di dimostrazioni. Per molti scienziati, l'obiettivo è anche quello di sostituire e perfezionare i test sugli animali.
- Il regolamento REACH richiede che tutte le sostanze chimiche presenti nel mercato europeo in quantità superiore ad una tonnellata l'anno abbiano idonee informazioni di sicurezza (REGOLAMENTO CE NO 1907/2006 - Registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche).
- Il REACH afferma che i Metodi di non testing possono essere usati per rispettare questo requisito.
- I modelli in silico vengono sviluppati a partire da dati esistenti derivanti da test in laboratorio, pertanto un modello può essere affidabile solo quanto i dati su cui si basa.
- I metodi in silico sono un'area di lavoro interdisciplinare, in cui i modelli sono sviluppati da esperti di chimica-informatica per essere utilizzati da tossicologi. La forza e l'uso di un modello dipende dal fatto che esso tenga conto chiaramente cosa il tossicologo e il regolatore necessitano per prendere la loro decisione.
- **Chemiometria:** la chemiometria è una scienza che utilizza metodi matematico-statistici per la risoluzione di problemi. Queste metodologie sono state inizialmente messe a punto per l'analisi di dati in campo chimico, ma oggi, data la loro estrema versatilità, trovano numerose possibilità di impiego anche in altri settori di differente natura. Generalmente i sistemi reali che poniamo sotto osservazione e dai quali



vogliamo trarre una informazione, sono di tipo multivariato, sono cioè governati da più variabili in contemporanea. Solo raramente sono di tipo univariato, però la maggior parte delle procedure statistiche ed analitiche non tiene conto di questo fatto e tende a trasformare in univariati tutti i problemi, anche quelli che sono intrinsecamente multivariati. La chemiometria consente un approccio di tipo multivariato al sistema da studiare: in questo modo permette di tenere conto di tutte le variabili in gioco, consentendo di sfruttare al meglio tutte le informazioni contenute nei dati da analizzare. La chemiometria oggi raccoglie al suo interno i metodi di classificazione, di modellamento e di regressione multivariata, l'analisi di similarità, l'analisi delle componenti principali e i diversi metodi ad essa collegati, i sistemi esperti e i metodi di intelligenza artificiale, le strategie basate sulle reti neurali, i metodi di disegno sperimentale e di ottimizzazione. L'insieme delle tecniche chemiometriche trova applicazione in molti e svariati campi: chimica analitica, spettroscopia, chimica ambientale, tossicologia, farmacologia. Fra le varie applicazioni, risulta particolarmente rilevante il campo del QSAR.

- **Metodologie QSAR:** per molte categorie di molecole è possibile compiere uno studio per cercare delle relazioni fra la struttura della molecola e la sua attività biologica. Negli studi QSAR (Relazione Quantitativa fra Struttura e Attività) viene preso in considerazione il momento di contatto tra la molecola in esame e il suo corrispondente recettore biologico: si cerca di collegare la tossicità e la farmacodinamica, conseguenti al legame con il recettore, con la struttura molecolare.
- Per una classe di molecole (cioè per sostanze abbastanza simili tra loro) il computer sarà in grado di dire quali saranno pericolose e quali innocue.

## Conclusioni

L'utilizzo di animali nella ricerca scientifica è un argomento molto controverso.

Dobbiamo di certo considerare ciò che i sostenitori della sperimentazione animale affermano, ovvero che tale pratica è essenziale nello sviluppo di nuove cure e per la prevenzione delle malattie umane (Brom 2002, Festing 2004), che le maggiori conquiste della medicina sono state possibili soltanto grazie alla sperimentazione animale (Pawlik 1998), che la complessità dell'organismo umano può essere modellata soltanto dalla complessità dell'animale (Kjellmer 2002).

Vi sono certamente degli esempi di casi specifici che rispondono alle affermazioni sopra citate. In effetti, il ruolo che hanno avuto, specie in passato, gli animali nella ricerca è stato rilevante, basti pensare all'identificazione dell'insulina (Banting e Best 1921) o alla scoperta del potenziale d'azione (Hodgkin e Huxley 1939). La scelta di un particolare modello animale dipende dalla domanda che viene posta. Il modello deve essere scelto in maniera tale che le caratteristiche biologiche essenziali che vogliamo investigare siano presenti e intatte. Ad esempio, i molluschi marini del genere *Aplysia* sono stati un modello molto utile per lo studio dei meccanismi molecolari del sistema nervoso, fondamentali per i processi di apprendimento, poiché presentano un sistema nervoso molto semplice e facilmente accessibile. Però questo mollusco è molto distante filogeneticamente dalla specie umana e pertanto presenta notevoli limitazioni comportamentali, quindi non è utile per comprendere altri meccanismi, come ad esempio, quelli neurocognitivi legati all'apprendimento. Molti premi Nobel hanno riguardato la ricerca su animali e che questa possa in alcuni casi risultare utile ad arricchire il bagaglio dell'esperienza e della conoscenza scientifica globale.

Tuttavia il fatto che le più grandi conquiste della medicina abbiano coinvolto gli animali non è condizione necessaria e sufficiente per non considerare gli altrettanti numerosi studi su animali che non hanno portato ad alcuna scoperta medica.

I test sugli animali, non sono soggetti a procedure formali di validazione, come invece avviene per i metodi non animali – *in vitro* ed *in silico* – ai fini dell'accettazione in ambito regolatorio.

Possiamo confrontare i dati derivanti da diverse specie animali con i dati derivanti dall'uomo e/o indagare sulla riproducibilità e ripetibilità dei test animali. Grazie ai valori di sensibilità e specificità possiamo dedurre i valori predittivi ed i rapporti di verosimiglianza, che nell'insieme ci permettono di valutare la rilevanza di una determinata metodologia. Gli studi

retrospettivi di questo tipo costituiscono una vera e propria procedura di validazione, essendo ufficialmente adottati anche da ECVAM per validare le metodologie non animali (*in vitro* o *in silico*) ai fini regolatori (Worth e Balls 2002, Worth e Zuang 2004).

Ci si aspetterebbe di reperire in letteratura una grande quantità di revisioni sistematiche che supportino la predittività e la validità dei modelli animali. In realtà invece i lavori di questo tipo sono relativamente scarsi e spesso incompleti.

Revisioni sistematiche che riguardano il confronto tra modelli animali e risultati clinici esistono anche per gli studi di tossicologia, farmacologia (parametri admet), cancerogenesi, teratogenesi, studi sugli scimpanzé (che sono considerati essere i modelli più vicini all'uomo), ictus, malattie neurodegenerative, modelli di sistema immunitario, asma, chemioterapia antitumorale, genetica delle malattie complesse (Williams et al. 2004) ed altri casi specifici.

I metodi alternativi, contribuiscono a definire un nuovo metodo critico nella valutazione delle metodologie sperimentali. Ciò implica misure e standard specifici che garantiscano la qualità dei risultati e la piena affidabilità degli strumenti, due cose da cui molte aree della scienza potrebbero trarre vantaggio.

Ma non c'è trasformazione possibile se non cambia la mentalità e senza l'impegno delle persone che hanno le competenze necessarie.

L'insegnamento dei metodi alternativi- non un puro e semplice resoconto storico dei cambiamenti intervenuti – è decisivo.

Per interessare un pubblico sempre più vasto l'insegnamento dovrebbe sia includere i concetti di qualità, rilevanza e utilità, che sono importanti anche in altre aree scientifiche, sia aiutare a sviluppare gli indicatori chiave di prestazione. È sorprendente, invece, come questi concetti fondamentali trovino raramente spazio negli approcci scientifici della ricerca. Per insegnare le 3R, l'espressione "metodi alternativi", con le sue diverse connotazioni, non sembra adatta a comunicare in modo corretto tutti i concetti sopra menzionati. Potrebbero essere più attraenti formule come Tossicologia fondata sull'evidenza, oppure su un nuovo metodo critico o, ancora, fondata super corsi o sistemi. In ogni caso, più importante di qualsiasi definizione è la necessità di insegnare un approccio alternativo piuttosto che dei metodi alternativi. Come afferma Goldberg (2004), "Dobbiamo trasmettere a coloro che vengono dopo di noi i principi e la pratica di una scienza umana".

## Bibliografia

Ahmed J., Gunther S., Moller F. & Preissner R. A structural genomics approach to the regulation of apoptosis: chimp vs. human. *Genome Informatics* (2007); 18, 22–34.)

Ahr H.J., Alepee N., Breier S., et al. Barriers to validation. A report by European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA) working group 5. *ATLA* (2008); 36:459-64.

Akhtar A.Z., Pippin J.J., et al. Animal models in spinal cord injury: a review. *Rev Neurosci.* (2008); 19(1):47-60.

Akhtar A.Z., Pippin J.J., et al. Animal studies in spinal cord injury: a systematic review of methylprednisolone. *Altern Lab Anim.* (2009); 37(1):43-62.

Alberto Manganaro, Milano Chemometrics and QSAR Research Group.

Andersen M.E. & Krewski D. Toxicity testing in the 21<sup>st</sup> century: bringing the vision to life. *Toxicol Sci.* (2009); 107:324–30.

Arora G., Polavarapu N., et al. Did natural selection for increased cognitive ability in humans lead to an elevated risk of cancer? *Medical Hypotheses* . (2009); 73, 453–456.

Arun K. Mandagere & Barry Jones da Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability (Methods and Principles in Medicinal Chemistry) Wiley-VCS (2003); P444–60.

Asif et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome *Nature* (2002); 420, 520-562

Bailey J. An assessment of the use of chimpanzees in hepatitis C research past, present and future: 1. validity of the chimpanzee model. *Altern Lab Anim* (2010); 38: 387-418.

Bailey J. Developmental toxicity testing: protecting future generations? *Altern Lab Anim.* (2008); 36(6): 718-21.

Bailey J. Lessons from chimpanzee-based research on human disease: the implications of genetic differences. *Altern Lab Anim.* (2011); 39(6):527-40.

Bailey J. Non-human primates in medical research and drug development: a critical review. *Biogenic Amines* (2005); 19(4-6): 235–255.

Bailey J., An Assessment of the Role of Chimpanzees in AIDS Vaccine Research, *Alternatives to Laboratory Animals* (2008); 381-428.

Bailey J., An Assessment of the Role of Chimpanzees in AIDS Vaccine Research, *Alternatives to Laboratory Animals* (2008); 381-428.

Bailey J., Knight A., et al. The future of teratology research is in vitro. *Biogenic Amines* (2005); 19(2): 97–145.

Bailey J., Knight A., et al. The future of teratology research is in vitro. *Biogenic Amines* (2005); 19(2): 97–145.

Balls M., Blaauboer B., Brusick D., et al. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA* (1990); 18:313-37.

Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., et al. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM Workshop 5. *ATLA* (1995); 23:129-47.

Balls, M. Are animal tests inherently valid? *ATLA: Alternatives to Laboratory Animals*, (2004); (Suppl. 1B), 755–758.

Bennett M. & Hart C. A. Feline immunodeficiency virus infection- a model for HIV and AIDS? *Journal of Medical Microbiology* (1995); 42:233-236.

Bertranpetit J., King M.C. et al. Comparative analysis of cancer genes in the human and chimpanzee genomes. *BMC Genomics* (2006); 7, 15.

Best C. H. & Scott D. A. The Preparation of Insulin (1923); 57: 709-723.

Blennow K., De Leon M. J, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* (2006); 368 (9533): 387-403.

Böhm S.V., Constantinou P., Tan S., Jin H., Roberts R.G. Profound human/mouse differences in alpha-dystrobrevin isoforms: a novel syntrophin-binding site and promoter missing in mouse and rat. *BMC Biol.* (2009); 7:85.

Borenfreund E. et al. Comparison of two in vitro cytotoxicity assays-the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro.* (1988); 2: 1-6.

Brady C.A. Of mice and men: the potential of high resolution human immune cell assays to aid the preclinical to clinical transition of drug development projects. *Drug Discovery world* (2008); 9:74-78.

Brady CA of mice and men: the potential of high resolution human immune cell assays to aid the preclinical to clinical transition of drug development projects. *Drug Discovery world* (2008); 9:74-78

Brom F.W. Science and society: different bioethical approaches towards animal experimentation. (2002); **19**, 78–82.

Buchanan-Smith H.M., Rennie A.E., Vitale A., et al. Harmonising the definition of refinement. *Animal Welfare* (2005); 14:379-84.

Burdan F. Comparison of developmental toxicity of selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors in CRL:(WI)WUBR Wistar rats–DFU and piroxicam study. *Toxicology.* (2005); 211(1-2):12-25.

Calarco J.A., Xing Y., Caceres M., Calarco J.P. et al. Global analysis of alternative splicing differences between humans and chimpanzees. *Genes & Development* (2007); 21, 2963–2975.

Coecke S., Balls M., Bowe G., et al. Guidance on Good Cell Culture Practice. (2005); 33, 261-287.

Cooper S., Adams E.J., Wells R.S., et al. A major histocompatibility complex class I allele shared by two species of chimpanzee. *Immunogenetics*. (1998); 47(3):212-7.

Coulston & Shubick, *Human Epidemiology and Animal Laboratory Correlations in Chemical Carcinogenesis*, Ablex Pub (1980).

Davis M.M. A prescription for human immunology. *Immunity*. (2008); 29(6):835-8.

De Boo M.J., Rennie A.E., Buchanan-Smith H.M., et al. The interplay between replacement, reduction and refinement: considerations where the three Rs interact. *Animal Welfare* (2005); 14:327-32.

De Maria A., Ugolotti E., Rutjens E., et al. Nkp44 expression, phylogenesis and function in non-human primate NK cells. *International Immunology* (2009); 21, 245–255.

Deeks J.J., & Altman D.G. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ*. (2004);329(7458):168-9.

Di Modugno Francesca, Iapicca, Pierluigi, Boudreau Aaron, et al. Splicing program of human MENA produces a previously undescribed isoform associated with invasive, mesenchymal-like breast. (2012).

Dr Hadwen. Trust For Humane Research. *Animals in laboratories: Let down by Labour* (2008).

Eastwood L. Findlay S., Poole, et al. Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4<sup>+</sup> effector memory T-cells. *Br J Pharmacol.* (2010); 161(3): 512–526.

Ema M., Ise R., Kato H., et al. Fetal malformations and early embryonic gene expression response in cynomolgus monkeys maternally exposed to thalidomide. *Reprod Toxicol.* (2010); 29(1):49-56.

Festing M.F.W. Is the use of animals in biomedical research still necessary in 2002? Unfortunately, “Yes”. *ATLA* (2004); Suppl. 1B, 733–739.

Fratta Sigg & Maiorana. Teratogenic effects of thalidomide in rabbits, rats, hamsters, and mice, *Toxicology and Applied Pharmacology* Volume 7, Issue 2, (1965); 268–286.

Glazko G., Veeramachaneni V., Nei M. et al. Eighty percent of proteins are different between humans and chimpanzees. *Gene* (2005); 346, 215–219.

Goldberg A. M. *Animals and Alternatives: Societal Expectations and Scientific Need.* (2004); 32, 545-551.

Goldberg A. M. *The role of an academic center.* (2010).

Grass G.M. & Sinko P.J. Physiologically-based pharmacokinetic simulation modelling. *Adv Drug Deliv Rev.* (2002); 54(3):433–5.

Hackam D.G.& Redelmeier D.A. Translation of research evidence from animals to humans. (2006); 296: 1731–1732.

Hartung T., Bremer S., Casati S., Coecke S., et al. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *ATLA* (2004); 32:467-72.

Hodgkin A.L. & Huxley A.F. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. (1939); *Nature* 144 (3651): 710.



Joseph M. McDevitt, Ronald F. Gautieri, David E. Mann Jr. Comparative teratogenicity of cortisone and phenytoin in mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (impact factor: 2.91). (1981); 70(6):631 – 634.

Khanna R. & Scott R. Burrows, Human immunology: a case for the ascent of non-furry immunology. *Immunology and Cell Biology* (2011); 89, 330–331

Kinsner-Ovaskainen A., Akkan Z., Casati S., et al. Overcoming Barriers to Validation of Non-animal Partial Replacement Methods/Integrated Testing Strategies: The Report of an EPAA–ECVAM Workshop. *ATLA* (2009); 37:1-8.

Kjellmer I. Animal experiments are necessary. Coordinated control functions are difficult to study without the use of nature's most complex systems: mammals and human beings *Lakartidningen* (2002); 99: 1172–1173.

Klein Obbink H.J. & Dalderup L.M. Effects of Thalidomide in the Rat Foetus. *Experientia* (1963); 12: 645-646.

Knight A. Chimpanzee experiments: questionable contributions to biomedical progress. *Altern Animal Testing Experimentation* (2008); 14: 119-24.

Knight BSc. & Andrew. The poor contribution of chimpancé experiments to biomedical progress. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. (2008);1-34

Knobloch J., Reimann K., Klotz L.O., et al. Thalidomide resistance is based on the capacity of the glutathione-dependent antioxidant defense. *Mol Pharm*. (2008); 5(6):1138-44.

Laule G.E., Bloomsmith M.A., et al. The use of positive reinforcement training techniques to enhance the care, management, and welfare of primates in the laboratory. *Journal Applied Animal Welfare Science* (2003); 6:163-73.

Legrand N., Ploss A., Balling R., et al. Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe* (2009); 6: 5–9.

Leslie M., Biomedical research. Immunology uncaged. Science (2010); 327 (5973):1573.

Lindl T., Voelkel M., et al. Animal experiments in biomedical research. An evaluation of the clinical relevance of approved animal experimental projects. (2005); 22(3):143-51.

Manciocco A., Chiarotti F., Vitale A., et al. The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease: The case of Parkinson's disease. Neuroscience & Biobehavioural Review (2009); 33:18-32.

Manciocco A., Romano E., Zoratto F et al. Sperimentazione animale, nuova Direttiva europea 2010/63. (2011)

Mariottini Gian luigi. Introduzione alle colture cellulari (Tecniche Nuove, 2010).

Mason G., McFarland D., et al. A demanding task: using economic techniques to assess animal priorities. Animal Behaviour (1998); 55:1071-5.

Massimo Tettamanti, L'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale in Italia.

Meganathan K., Jagatp S., Gaspar J.A., et al. Embryonic stem cells differentiation substantiates thalidomide teratogenicity Toxicology Letters Volume (2012).

Mestas J. & Hughes C.C.W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. Journal of Immunology (2004); 172:2731–2738.

Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Met. (1983); 65: 55-63.

Nishimura H. & Miyamoto S., Teratogenic effects of sodium chloride in mice. *Acta Anat. Nippon* (1969); 74:121–124.

OECD 2005. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. ENV/JM/MONO (2005).

OECD 404, Guideline for the testing of chemicals “Acute dermal/irritation Corrosion” (2002).

OECD Series on Testing and Assessment 34, 96 pp. Paris, France.

Olsson IAS & Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. *Laboratory Animals* (2002); 36:243-70.

ORCHESTRA e-book “theory, guidance and applications on QSAR and REACH”.

Osswald, W. Ethics of animal research and application to humans. *Acta Medica Portuguesa* (1992); 5: 222–225.

Parkie M. & Webb M. Embryotoxicity and teratogenicity of thalidomide in rats. *Teratology*. (1983); 27(3):327-32.

Perin G. *Ecotossicologia – Ambiente e salute* (2004)

Penco Sunanna. *Metodi alternativi e innovativi. Un altro modo di fare ricerca a vantaggio dell’uomo nel rispetto degli animali.* Aracne (2008).

Pierro & Margherita. Sviluppo e validazione di un sistema microfluidico per la generazione e coltura di tessuto cartilagineo umano. (2011).

Podolsky, Daniel K., Sands, et al. New Life in a Sleeper: Thalidomide and Crohn’s Disease. (1999); 1485-7.

Prescott M.J. & Buchanan-Smith H.M. Training nonhuman primates using positive reinforcement techniques. *Journal Applied Animal Welfare Science* (2003); 6:157-61.

Preuss, Evgeny I. Rogaev, Jeffrey D. Jensen, Zhiping Weng, et al. Human-Specific Histone Methylation Signatures at Transcription Start Sites in Prefrontal Neurons *PLoS Biol.* (2012).

Prof. Todeschini Roberto. Milano Chemometrics and QSAR Research Group.

Puente X.S., Ordonez G.R., Hillier L.W. et al. Comparative genomic analysis of human and chimpanzee proteases. *Genomics* (2005); 86, 638–647

Riddell R.J. et al. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food. Chem. Toxicol.* (1986); 24:469-471.

Russell W.M.S. & Burch R.L. *The principles of humane experimental technique.* Wheathampstead, England: Universities Federation for Animal Welfare; (1959) (reprinted in 1992).

Schardein J.: *Drugs as Teratogens* CRC Press. (1976).

Schnabel J. Standard model. *Nature* (2008); 454:682–685.

Sena E., Van Der Worp H., Bath,P., et al. Publication Bias in Reports of Animal Stroke Studies Leads to Major Overstatement of Efficacy *PLoS Biology*, (2010).

Shanks N., Greek R., et al. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med.* (2009); 4: 2.

Somers G.F. Pharmacological properties of thalidomide ( $\alpha$ -phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug. *Br J Pharmacol Chemother.* (1960); 15(1): 111–116.

Soto P.C., Stein L.L., Hurtado-Ziola N., et al. Relative over-reactivity of human versus chimpanzee lymphocytes: Implications for the human diseases associated with immune activation. *Journal of Immunology* (2010); 184, 4185–4195.

Sterz H., Hans Nothdurft, Peter Lexa et al. Teratologic studies on the Himalayan rabbit: new aspects of thalidomide-induced teratogenesis *Arch Toxicol* (1987); 60:376-381.

Stewart K.L. & Bayne K. Environmental enrichment for laboratory animals In: Reuter JD, Suckow MA (Eds.). *Laboratory animal medicine and management.* Ithaca, New York: International Veterinary Information Service (2004).

Suntharalingam G., Perry M.R., Ward S., et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* (2006); 355: 1018–1028.

Teo S.K., Denny K.H., Stirling D.I., et al. Hoberman Effects of thalidomide on developmental, peri- and postnatal function in female New Zealand white rabbits and offspring *Toxicol Sci*, (2004); 81: 379–389.

The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium: Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* (2005); 437(7055):69-87.

Vandenberg J.L. et al. A unique biomedical resource at risk. *Nature*, London (2005); 437, 30-32.

Varki A. & Altheide T.K. Comparing the human and chimpanzee genomes: searching for needles in a haystack. *genome Res.* (2005); 15(12): 1746-58.

Visentin S. Utilizzo di test di vitalità cellulare nella determinazione di citotossicità di dispositivi medici. (2009).

Vitale A., Mancio A., et al. The 3R principle and the use of non-human primates in the study of neurodegenerative diseases: the case of Parkinson's disease. *Neuroscience & Biobehavioural Review* (2009); 33:33-47.

Von Herrath M.G. & Nepom G.T. Lost in translation: barriers to implementing clinical immunotherapeutics for autoimmunity. *J Exp Med* (2005); 202:1159–1162.

Weatherall Sir David. A working group report chaired. The use of non-human primates in research; *FRS FMedSci* (2006).

Wells P.G., Bhuller Y., Chen C.S., et al. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2005); 1;207(2 Suppl):354-66.

Wichmann T., Kliem M.A., et al. Antiparkinsonian and behavioral effects of inactivation of the substantia nigra pars reticulata in hemiparkinsonian primates. *Experimental Neurology* (2001); 167:410-24.

Worth A, Zuang V. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *Altern Lab Anim.* (2004); 32(5):467-72.

Worth A.P. & Balls M. The principles of validation and the ECVAM validation process. (2002); Suppl. 2, 15–21.

Zeng J., Konopka G., Hunt B.G., et al. Divergent whole-genome methylation maps of human and chimpanzee brains reveal epigenetic basis of human regulatory evolution. *Am J Hum Genet.* (2012); 91(3):455-65.

*Commissione Europea. Direttiva 86/609/CEE del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L358:1-28.*

*Commissione Europea. Direttiva 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 maggio 1999 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee 30 luglio 1999 L200: 1-68.*

*Commissione Europea. Direttiva 76/768/CEE del Consiglio, del 27 luglio 1976, concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative ai prodotti cosmetici e relativa settima modifica mediante la Direttiva 2003/15/CE. Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee 27 settembre 1976 L262: 169-200.*

*Commissione Europea. Direttiva 98/8/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 febbraio 1998 relativa all'immissione sul mercato dei biocidi. Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee 24 aprile 1998. L123: 1-63.*

*Commissione Europea. Regolamento n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la Direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la Direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea 30 dicembre 2006. L396: 1-279.*

*Comunità Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L1276 del 20 ottobre 2010.*

*Consiglio delle Comunità Europee. Direttiva 86/609/CEE del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici (86/609/CEE).*

*European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-general. The need for non-human primates in biomedical research. Statement of the Scientific Steering Committee adopted at its Meeting of 4-5 april 2002. Disponibile all'indirizzo: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out253\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out253_en.pdf); ultima consultazione 17/02/2012.*

*European Commission. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal European Union 2010;276:33-79.*

*Gazzetta Ufficiale del Consiglio d'Europa L358 del 18 dicembre 1986, p. 1-28. Disponibile all'indirizzo: [www.uniss.it/documenti/sppis/Dir\\_86\\_609\\_CEE.pdf](http://www.uniss.it/documenti/sppis/Dir_86_609_CEE.pdf); ultima consultazione 9/2/2012.*

*Home Office. Guidance on the operation of the animals (Scientific Procedures Act) 1986. London: TSO; 2000.*

*Italia. Decreto Legislativo 15 febbraio 2005, n. 50. Attuazione delle Direttive 2003/15/CE e 2003/80/CE in materia di prodotti cosmetici. Gazzetta Ufficiale - Serie Generale n. 87 del 15 aprile 2005.*

*Italia. Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116. Attuazione della Direttiva n. 86/609 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Gazzetta Ufficiale – Supplemento ordinario n. 40, 18 febbraio 1992.*

*Unione Europea. Direttiva 86/609/CEE del 24 novembre 1986 - concernente il riavvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri alla protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea n. L358, 18 dicembre 1986.*

*Unione Europea. Trattato di Lisbona sul Funzionamento dell'Unione Europea (TFUE) del 05 maggio 2008. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. C115, 9 maggio 2008.*