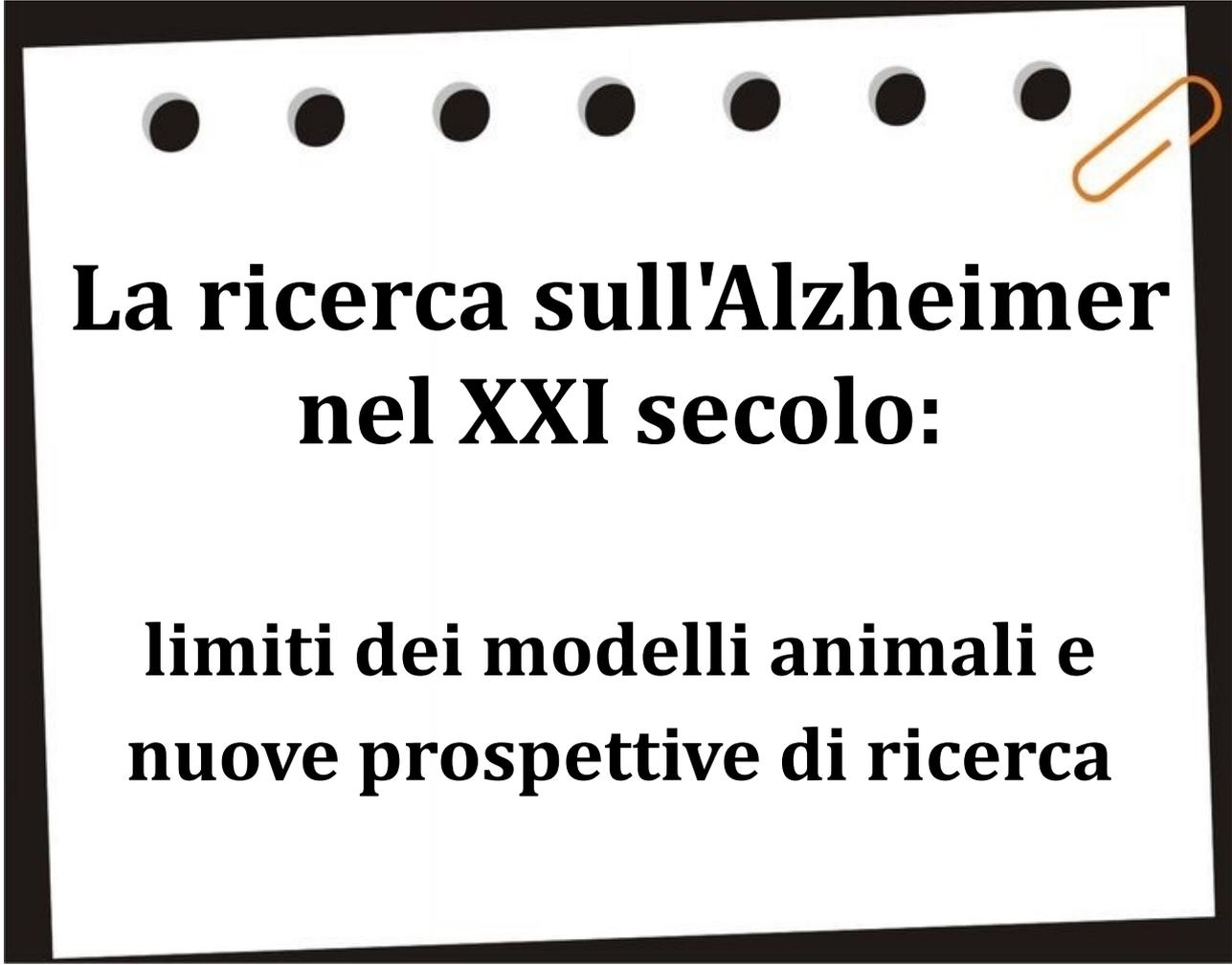




I Quaderni di OSA



La ricerca sull'Alzheimer nel XXI secolo:

**limiti dei modelli animali e
nuove prospettive di ricerca**



www.oltrelasperimentazioneanimale.eu

Email: oltrelasperimentazioneanimale@gmail.com

 Osa Oltre La Sperimentazione Animale

La ricerca sull'Alzheimer nel XXI secolo: limiti dei modelli animali e nuove prospettive di ricerca

Francesca Pistollato

European Commission, Joint Research Centre, Ispra (Italy)
Commissione Europea, Centro Comune di Ricerca, Ispra (Italia)
Comitato scientifico di O.S.A.

Attualmente quasi 50 milioni di persone nel mondo soffrono di demenza, con costi globali per la spesa sanitaria pubblica stimati intorno ai 900 miliardi di dollari l'anno. Il morbo di Alzheimer, in particolare, rappresenta la più comune forma di demenza, con il 60-80% dei casi [1].

Negli ultimi dieci anni non sono stati sviluppati nuovi farmaci e quelli disponibili possono solo stabilizzare i sintomi temporaneamente e solamente in alcuni pazienti. Sembra che la ricerca sull'Alzheimer sia giunta a un vicolo cieco, in particolare per quanto riguarda la ricerca e lo sviluppo di nuovi farmaci.

Uno studio del 2014 ha evidenziato che dei 244 farmaci testati in 413 trial clinici dal 2002 al 2012, nessuno di essi si è tradotto in un trattamento efficace per i pazienti, il che equivale ad un tasso di fallimento pari al 99,6% [2].

Un'analisi ancora più recente condotta dall'organizzazione non-profit statunitense *Physicians Committee for Responsible Medicine* (PCRM) ha evidenziato che nessuno dei 1273 trial clinici condotti da gennaio 2004 a luglio 2017 ha portato all'approvazione di nuovi farmaci.

Ad oggi esistono solo quattro farmaci approvati per il trattamento dei vari stadi della malattia; tali farmaci offrono benefici minimi di carattere sintomatico e solamente in una minoranza di pazienti, ma nessun beneficio a lungo termine per quanto riguarda un miglioramento della prognosi o la sopravvivenza [3].

La maggior parte della ricerca farmacologica per l'Alzheimer si è focalizzata sulle proteine beta amiloidi, classicamente considerate la causa scatenante della malattia. È, infatti, noto che nei pazienti affetti da Alzheimer si accumulano progressivamente proteine beta amiloidi a livello cerebrale, che portano a un progressivo deterioramento neuronale e funzionale. Questo processo è comunemente definito come "ipotesi (o cascata) amiloide".

L'ipotesi amiloide ha portato la comunità scientifica a investire notevoli risorse nello sviluppo e la creazione di nuovi farmaci atti a contrastare l'accumulo di tali proteine. Tuttavia si è scoperto che la formazione e l'accumulo delle proteine amiloidi potrebbe non essere la causa scatenante della patologia, ma semplicemente una delle caratteristiche o una conseguenza della patologia stessa. Per esempio, si è visto che alcuni farmaci possono rimuovere le placche amiloidi dal cervello, ma la loro rimozione non si è tradotta in un miglioramento delle capacità cognitive nei pazienti o della prognosi.

Un altro tratto tipico della sindrome di Alzheimer è l'accumulo della proteina tau fosforilata, che viene indotta dalle placche amiloidi e può determinare una distruzione delle funzioni neuronali. Tuttavia, a dispetto di quanto si credesse, l'accumulo di proteina tau appare progredire anche in

seguito alla rimozione delle placche amiloidi [3]. Tutto questo indica che, ad oggi, molti degli aspetti molecolari e cellulari della sindrome di Alzheimer non sono ancora del tutto compresi.

Per cercare di capire le ragioni alla base di questi insuccessi nella ricerca sull'Alzheimer dovremmo prendere in considerazione quali sono gli strumenti e i modelli sui quali da lungo tempo la ricerca scientifica si è focalizzata.

In campo biomedico la ricerca scientifica si è tradizionalmente basata sullo sviluppo e l'utilizzo di modelli animali per simulare le malattie umane. In questo la ricerca sull'Alzheimer non ha fatto eccezione, investendo ingenti risorse nella creazione soprattutto di modelli murini transgenici con lo scopo principale di riprodurre alcuni dei tratti patologici e genetici della malattia in questi topi. Una delle possibili cause del fallimento nella ricerca sull'Alzheimer potrebbe ricondursi ad una sovrastima e sovra utilizzo proprio di tali modelli animali. I topi transgenici comunemente utilizzati per studiare l'Alzheimer possono mostrare alcune delle caratteristiche della patologia, quali la formazione delle placche amiloidi, di grovigli neurofibrillari, la gliosi, alcune alterazioni sinaptiche, mostrando anche alcuni segni di ritardo cognitivo.

Tuttavia questi modelli animali presentano anche dei limiti evidenti; per esempio non sono in grado di riprodurre la complessità sia clinica che patologica della malattia così come noi la osserviamo negli esseri umani. Inoltre, tutti i trattamenti sviluppati fino ad oggi si sono inizialmente basati sull'utilizzo di animali, con risultati incoraggianti, per poi risultare fallimentari nei pazienti affetti da Alzheimer [4].

Altro aspetto rilevante è che i modelli animali possono anche contribuire a generare risultati falsi negativi (cioè risultati che portano erroneamente a rifiutare le ipotesi sulle quali essi sono stati condotti) che possono portare all'esclusione dai trial clinici di composti terapeutici potenzialmente efficaci per l'uomo.

Un altro aspetto rilevante è che i modelli di topi transgenici attualmente disponibili sono stati creati principalmente come surrogati dell'Alzheimer precoce, di origine familiare, o collegato a fattori di tipo genetico, che rappresenta la tipologia di Alzheimer meno prevalente (circa il 3% di tutti i casi di Alzheimer). Al contrario, la forma più diffusa di Alzheimer (97%) è l'Alzheimer a insorgenza tardiva (dopo i 65 anni di età), o anche definito sporadico poiché non ereditario e non può essere ricondotto ad un qualche gene specifico. Questo rappresenta di per sé un paradosso, considerando che si sono investiti molti soldi nella creazione di modelli murini transgenici che si basano prevalentemente su una tipologia di Alzheimer familiare/genetico a minore prevalenza. Tali modelli transgenici sono invece poco utili o completamente inutili nello studio dell'Alzheimer più prevalente, ovvero quello sporadico, ad insorgenza tardiva.

Esiste un modello di topo chiamato SAMP8 (Senescence Accelerated Mouse Prone 8) che tende a invecchiare precocemente e che si ritiene possa essere utile per lo studio dell'Alzheimer tardivo, o di altre patologie neurodegenerative. Vi sono inoltre dei ceppi murini varianti del modello SAMP8, chiamati SAMP8-APP, SAMP8-PS1 e SAMP8-APP/PS1, caratterizzati da alcune mutazioni genetiche descritte nell'Alzheimer a livello del gene del precursore della proteina beta amiloide (APP) e del gene della presenilina 1 (PS1 o PSEN1). Se da un lato si ritiene che questi modelli murini SAMP possano essere utilizzati per studiare l'Alzheimer tardivo, d'altro canto i geni responsabili della senescenza sono perlopiù ancora sconosciuti. Oltre a questo, non esistono ad oggi degli studi che abbiano dimostrato l'efficacia di farmaci attualmente disponibili per l'Alzheimer specificamente in questi topi [5].

I finanziamenti stanziati per la ricerca sull'Alzheimer hanno favorito progetti di ricerca destinati alla creazione e/o utilizzo di modelli animali per l'Alzheimer, rispetto a progetti basati sull'utilizzo di modelli possibilmente più rilevanti per la specie umana (*Human-relevant*), che solo in anni più recenti sono stati progressivamente considerati. Questo è ciò che uno studio pubblicato sulla rivista *Oncotarget* ha evidenziato, prendendo in considerazione la situazione negli Stati Uniti d'America [6]. Questo trend si è registrato negli Stati Uniti, ma realisticamente riguarda o ha riguardato anche l'Europa e altri paesi del mondo.

Se da un lato i modelli animali hanno contribuito a generare dati e informazioni su alcuni dei meccanismi cellulari e molecolari relativi alla formazione delle placche amiloidi e alla proteina tau, dall'altro lato sono stati assolutamente inutili e fuorvianti per lo sviluppo di farmaci utili a curare l'Alzheimer negli esseri umani.

Si deve inoltre considerare che l'eziopatogenesi dell'Alzheimer è multidimensionale ed estremamente complessa. Numerosi sono i fattori legati allo stile di vita che determinano il rischio di sviluppare l'Alzheimer e il consolidamento della patologia stessa, fra cui l'età avanzata (considerando che l'Alzheimer tardivo si sviluppa in tarda età), la dieta (ad esempio, diete ricche di grassi saturi e di proteine di origine animale e povere di cibi di origine vegetale incrementano il rischio di sviluppare la malattia [7]), la scarsa attività fisica, una ridotta stimolazione cognitiva, un basso livello socio economico, un basso livello d'istruzione, una scarsa qualità del sonno (implicata nell'accumulo delle placche amiloidi [8]), una disbiosi cronica intestinale [9], l'inquinamento atmosferico, il fumo, l'ingestione tramite la dieta di metalli, pesticidi e insetticidi, e i fattori di rischio associati alla patologia cardiovascolare e alla sindrome metabolica. A proposito di quest'ultimo aspetto, l'Alzheimer è stato in anni recenti anche definito come diabete cerebrale o diabete di tipo III.

È evidente che è impossibile studiare in un modello animale, come il topo, tutti questi fattori così intrinsecamente legati alla vita umana. È altresì cruciale che la ricerca biomedica cambi in qualche modo i propri paradigmi, soprattutto quando il fine ultimo è la creazione di farmaci utili all'uomo.

Guardando al settore della tossicologia moderna è avvenuto da tempo un progressivo cambiamento di paradigma: negli ultimi vent'anni si è verificata una transizione dall'uso di metodi basati sull'utilizzo di animali, a metodi *animal-free*, in cui vengono prediletti sistemi *in vitro*, *in silico* e che integrati assieme si ritiene possano avere una maggiore rilevanza per lo studio della fisiologia e della tossicologia nell'essere umano.

Il documento pubblicato nel 2007 negli Stati Uniti d'America intitolato "*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*" [10], così come la Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici [11] incoraggiano l'utilizzo di alternative alla sperimentazione animale introducendo anche il concetto di "*Adverse Outcome Pathway*" (AOP, traducibile come "via degli esiti avversi"). Le AOP vengono create per riassumere le informazioni relative agli effetti di sostanze chimiche ambientali o di qualsiasi altra sostanza, descrivendo nei dettagli i meccanismi sia cellulari che molecolari (a livello di geni e proteine) alla base di questi effetti, prendendo in considerazione diversi livelli di complessità biologica (popolazione, individuo, organo, tessuto, cellula, e molecole).

L'organizzazione delle conoscenze riguardanti gli effetti delle sostanze chimiche tramite questo tipo di approccio concettuale, si potrebbe anche facilmente applicare al settore della ricerca biomedica, ad esempio per identificare i segnali molecolari che vengono alterati con l'insorgenza di una certa patologia [12, 13]. Potremmo chiederci, per esempio, quali sono i segnali molecolari che risultano perturbati durante la fase di insorgenza dell'Alzheimer e se possiamo collegare fattori di tipo ambientale e genetico a questa patologia [13, 14].

Esistono inoltre numerosi strumenti e modelli che si possono già oggi utilizzare al posto dei modelli animali per la ricerca sull'Alzheimer.

Per esempio, vi sono numerosissime pubblicazioni scientifiche che riportano analisi di tipo osservazionale, epidemiologico e interventistico, direttamente condotte nei pazienti affetti dalla patologia, e che rappresentano un bacino di dati essenziali per lo studio dell'Alzheimer.

L'utilizzo di tessuti *ex vivo* derivati da biopsie di pazienti, campioni di sangue, campioni di liquido cerebrospinale, tessuti collezionati *post-mortem* (dopo il decesso del paziente) può permettere l'identificazione di biomarcatori della patologia.

Varie tecniche di neuro-immagine sempre più avanzate sono attualmente disponibili, e potrebbero essere utilizzate per studiare in modo non invasivo gli effetti di trattamenti farmacologici e non-farmacologici (ad esempio, gli effetti di certi tipi di interventi nutrizionali [15]) sulla funzionalità cerebrale. Questi dati potrebbero essere correlati ai segnali molecolari che risultano alterati in presenza di patologia, e ai risultati dei test cognitivi su pazienti.

Esistono inoltre numerosi modelli cellulari (*in vitro*), ad esempio quelli basati sulle cellule staminali indotte pluripotenti (dette iPS) che possono essere ottenute direttamente dai pazienti e convertite in neuroni. Tali cellule si possono coltivare *in vitro* anche in strutture tridimensionali (3D), e hanno permesso in anni recenti d'identificare nuovi possibili candidati terapeutici per il trattamento dell'Alzheimer [16].

Sistemi tissutali ancora più complessi, comunemente chiamati "*organ-on-chip*" possono essere utilizzati per riprodurre in modo più fedele alcune strutture tissutali del cervello, permettendo un'analisi più realistica dei processi fisiologici e patologici.

Per l'analisi di geni e proteine è oggi possibile utilizzare tecnologie definite 'omiche'¹ e modelli computazionali. L'integrazione di tutti questi modelli e strumenti potrebbe permettere la scoperta dei segnali molecolari della patologia, sia al momento della sua insorgenza, che durante la sua progressione, così come l'identificazione di nuovi target terapeutici, e la valutazione dell'efficacia e tossicità di nuovi farmaci riducendo costi e tempistiche.

Ovviamente è indispensabile investire nell'ottimizzazione e la qualificazione di questi nuovi modelli *in vitro*, così come nel miglioramento della qualità dei tessuti *post-mortem*, mediante la creazione di banche di tessuti e cellule che funzionino in maniera efficiente e nel rispetto di norme e tempistiche opportune [6].

Oltre alle sfide di tipo tecnico, ci sono inevitabilmente anche delle sfide legate ad aspetti di tipo scientifico e normativo, considerando la necessità di nuovi approcci normativi, e di persuadere

¹ Dal dizionario Treccani: Si definiscono *scienze omiche* quelle discipline che utilizzano tecnologie di analisi che consentono la produzione di informazioni (dati), in numero molto elevato e nello stesso intervallo di tempo, utili per la descrizione e l'interpretazione del sistema biologico studiato. Vedi: http://www.treccani.it/enciclopedia/scienze-omiche_%28Enciclopedia-Italiana%29/

l'industria, gli enti finanziatori della ricerca e la comunità scientifica in generale della necessità di un cambiamento sempre più in senso olistico, multidisciplinare e integrato.

Inoltre, considerando l'importanza dello stile vita nell'insorgenza dell'Alzheimer, si dovrebbe investire molto di più in prevenzione.

A livello Europeo vi sono alcuni progetti finanziati dalla Commissione Europea che si stanno già muovendo verso la giusta direzione.

Ad esempio, lo *Human Brain Project*² mira a fornire ai ricercatori di tutto il mondo strumenti ICT (Information & Communication Technology) e modelli matematici per la condivisione e l'analisi di grandi dati per capire come funziona il cervello umano e per emularne le capacità computazionali.

Inoltre la piattaforma di ricerca *Innovative Medicine Initiative* sta attualmente promuovendo la ricerca traslazionale sull'Alzheimer in Europa con tre progetti altamente complementari (EMIF, Actionomy, ed EPAD) [17].

L'auspicio è che attraverso l'integrazione di diverse aree di competenza e d'indagine sia finalmente possibile fare ricerca in una maniera davvero utile per i molti pazienti affetti o a rischio di Alzheimer che sono in attesa di cure nuove ed efficaci, e che il lavoro di noi scienziati possa davvero avere un impatto positivo sulla salute pubblica, ma nel rispetto della vita di tutte le specie animali, umana e non-umane.

REFERENZE

1. Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2016. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>
2. Cummings, J.L., T. Morstorf, and K. Zhong, Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther*, 2014. 6(4): p. 37.
3. PCRM. Retiring the Amyloid Cascade Hypothesis as a Cause of Alzheimer's. 2017 09 July 2017]; Available from: <http://www.pcrm.org/research/good-science/retiring-the-amyloid-cascade-hypothesis-as-a-cause-of-alzheimers>
4. Cavanaugh, S.E., J.J. Pippin, and N.D. Barnard, Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward. *ALTEX*, 2014. 31(3): p. 279-302.
5. Porquet, D., et al., Amyloid and tau pathology of familial Alzheimer's disease APP/PS1 mouse model in a senescence phenotype background (SAMP8). *Age (Dordr)*, 2015. 37(1): p. 9747.
6. Pistollato, F., et al., Alzheimer disease research in the 21st century: past and current failures, new perspectives and funding priorities. *Oncotarget*, 2016. 7(26): p. 38999-39016.
7. Pistollato, F., et al., Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A focus on human studies. *Pharmacol Res*, 2018. 131: p. 32-43.
8. Pistollato, F., et al., Associations between Sleep, Cortisol Regulation, and Diet: Possible Implications for the Risk of Alzheimer Disease. *Adv Nutr*, 2016. 7(4): p. 679-89.

² <https://www.humanbrainproject.eu/en/>



9. Pistollato, F., et al., Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutr Rev*, 2016. 74(10): p. 624-34.
10. (NRC), N.R.C. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. National Academy Press, Washington, DC. , 2007.
11. Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici 2010. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063>
12. Langley, G.R., Considering a new paradigm for Alzheimer's disease research. *Drug Discov Today*, 2014. 19(8): p. 1114-24.
13. Langley, G., et al., Lessons from Toxicology: Developing a 21st-Century Paradigm for Medical Research. *Environ Health Perspect*, 2015. 123(11): p. A268-72.
14. Langley, G.R., et al., *Towards a 21st-century roadmap for biomedical research and drug discovery: consensus report and recommendations*. *Drug Discov Today*, 2017. 22(2): p. 327-339.
15. Pistollato, F., et al., *The Use of Neuroimaging to Assess Associations Among Diet, Nutrients, Metabolic Syndrome, and Alzheimer's Disease*. *J Alzheimers Dis*, 2015. 48(2): p. 303-18.
16. Mullard, A., *Stem-cell discovery platforms yield first clinical candidates*. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. 14(9): p. 589-91.
17. Vaudano, E., et al., *Boosting translational research on Alzheimer's disease in Europe: The Innovative Medicine Initiative AD research platform*. *Alzheimers Dement*, 2015. 11(9): p. 1121-2.

Francesca Pistollato si è laureata in Biologia presso l'Università degli Studi di Padova, dove ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in Scienze dello Sviluppo e Medicina della Programmazione. Ha lavorato nel settore delle neuroscienze sia negli Stati Uniti sia in seguito presso l'Università di Padova. Ha inoltre conseguito un Master di II livello in Nutrizione e Dietetica presso l'Università Politecnica delle Marche. Attualmente lavora presso il Centro Comune di Ricerca della Commissione Europea (Ispra, Varese) sulle metodiche alternative alla sperimentazione animale in tossicologia. È autrice e coautrice di numerose pubblicazioni scientifiche, libri scientifici, e presentazioni a congressi nazionali e internazionali. È membro del comitato scientifico di O.S.A. – Oltre la Sperimentazione Animale.