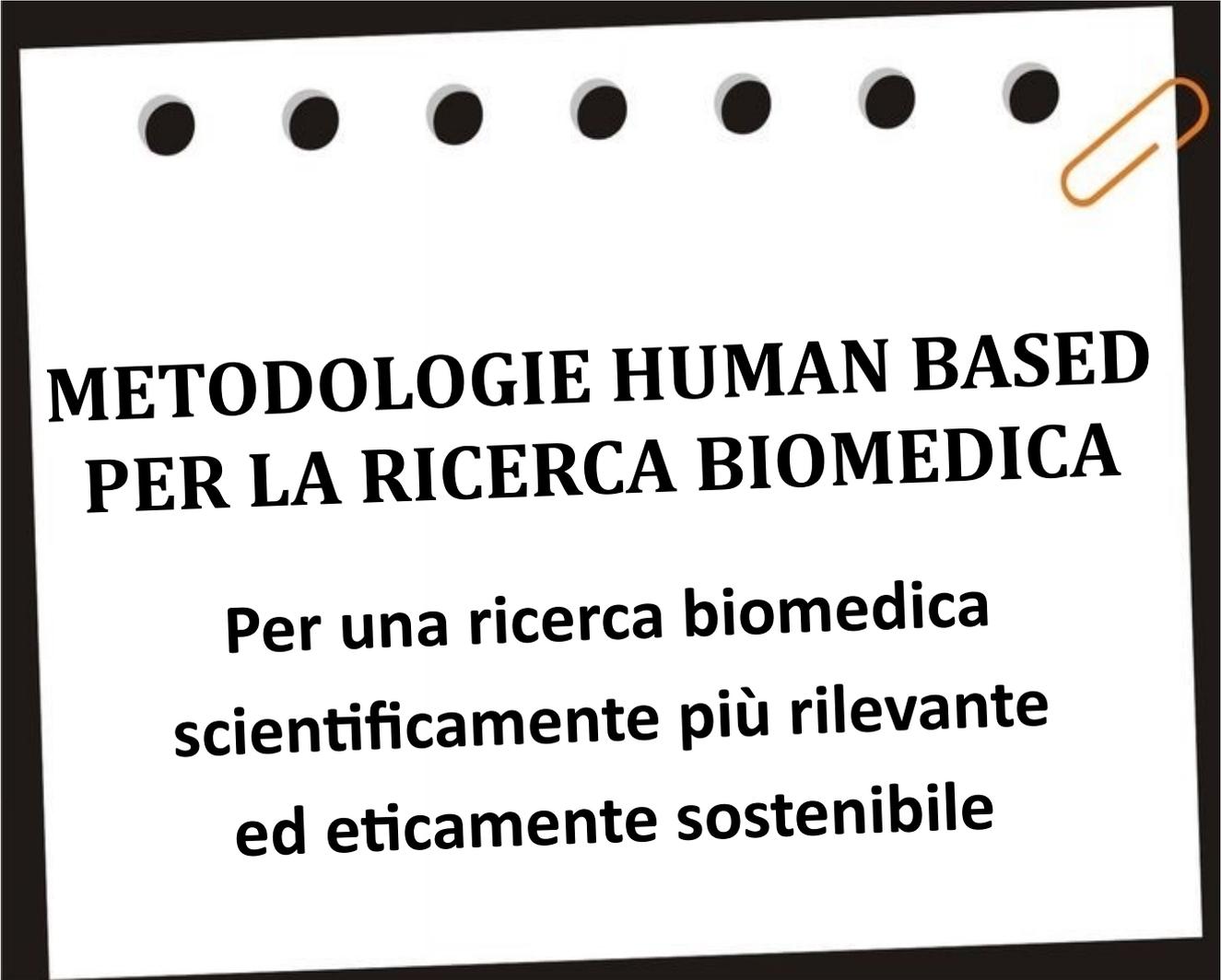




I Quaderni di OSA



METODOLOGIE HUMAN BASED PER LA RICERCA BIOMEDICA

**Per una ricerca biomedica
scientificamente più rilevante
ed eticamente sostenibile**



www.oltrelasperimentazioneanimale.eu

Email: oltrelasperimentazioneanimale@gmail.com

 Osa Oltre La Sperimentazione Animale



METODOLOGIE HUMAN BASED PER LA RICERCA BIOMEDICA

Per una ricerca biomedica scientificamente rilevante ed eticamente sostenibile

Manuela Cassotta

Biologa, Biotecnologa - Trieste
Comitato scientifico di O.S.A.

Prefazione

Siamo di fronte a un grande e rapidissimo sviluppo tecnologico come mai si era visto precedentemente nel corso della storia dell'umanità... tuttavia molte malattie croniche che ci affliggono sono in aumento, mentre le conoscenze dei meccanismi che sottostanno a tali condizioni e le cure effettive sono insufficienti.

Attualmente oltre il 90% dei candidati farmaci che hanno superato i test *in vitro* e sugli animali non passano i successivi test sugli esseri umani, principalmente a causa di effetti collaterali imprevisti o a mancanza di efficacia.

Nel 2016, solo in Italia, sono stati impiegati oltre 610 mila animali vertebrati a scopo di ricerca. Non solo la sperimentazione animale è poco accettata dal punto di vista umano ed etico ma rappresenta anche un problema di tipo scientifico e metodologico.

Per questo è urgente e doveroso sviluppare e promuovere dei metodi alternativi maggiormente predittivi della fisiologia umana e rispettosi del benessere animale.

È importante precisare che il problema del fallimento dei candidati farmaci in fase clinica non è dovuto soltanto ai limiti dei modelli animali (*in vivo*) ma di tutta la fase pre-clinica, compresi i metodi *in vitro*.

Forgiato nei primi anni del 1960, il paradigma per l'innovazione farmaceutica è rimasto praticamente invariato per quasi 50 anni. Durante un periodo in cui la maggior parte delle altre industrie basate sulla ricerca hanno adottato frequenti, e spesso radicali, modifiche ai loro processi di Ricerca e Sviluppo, il settore farmaceutico continua ad utilizzare un processo di sviluppo lento, inefficiente, rischioso e costoso.

Uno dei maggiori obiettivi della Tossicologia del XXI secolo è infatti un cambio di paradigma, che prevede una maggiore focalizzazione sulla biologia umana, l'implementazione di metodi *in vitro* che rappresentino maggiormente le condizioni fisiologiche umane e un progressivo abbandono dei tradizionali test sugli animali.

In questo opuscolo si intende fornire una panoramica generale delle più importanti e recenti tecnologie ed approcci già disponibili e fruibili, al servizio della ricerca biomedica moderna. Promuovere l'utilizzo integrato e lo sviluppo di tali metodologie significa allinearsi al paradigma di ricerca emergente e promuovere una scienza più etica e rispettosa degli esseri viventi.



INDICE

Prefazione

Le metodologie di ricerca avanzate e il paradigma emergente del XXI secolo

1 Metodi biologici

1.1 Colture cellulari e tissutali umane

1.2 Organoidi umani e cellule staminali

1.3 Colture dinamiche connesse: organi su chip, bioreattori multicompartimentali modulari

1.4 L'uomo come modello sperimentale: studi clinici, *microdosing*, tecniche di *imaging*, stimolazione magnetica transcranica

2 Metodi *in silico* e modelli matematici

2.1 Qsar, fegato virtuale, cuore virtuale

3 Scienze omiche: genomica, proteomica, metabolomica, esposomica

3.1. Genomica

3.2. Proteomica

3.3. Metabolomica

3.4. Eposomica

4 Metodi *in chemico*

5 Metodi chimici, biomolecolari ed altri

5.1 Spettrometria di massa e spettrometria di massa ultrasensibile;

5.2 Tecnologia microarray (DNA-chip)

5.3 Tecniche avanzate di modifica del genoma: CRISPR/Cas9;

5.4 Alternative agli anticorpi monoclonali: affimeri

5.5 Alternative al siero fetale bovino

5.6 Stampanti e Bio-stampanti tridimensionali (3D)

Le metodologie di ricerca avanzate e il paradigma emergente del XXI secolo

Secondo i dati della Food and Drug Administration statunitense (FDA), meno del 5% dei farmaci risultati efficaci durante i test preclinici, sia *in vitro* che *in vivo* su animali superano le successive fasi cliniche su volontari umani per motivi di inefficacia e/o tossicità.

Nel 2004, attraverso la pubblicazione di un report “*Innovation/Stagnation: Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products*”, l’FDA ha lanciato un’iniziativa per analizzare le cause del fallimento e portare l’innovazione nella ricerca e nel processo di sviluppo dei farmaci ad uso umano.

Le principali cause di fallimento sono state attribuite all’inadeguatezza dei modelli di ricerca preclinici tradizionali, incapaci di predire adeguatamente la tossicità e l’efficacia dei farmaci negli esseri umani. Il report conclude che è necessaria un’azione collettiva per modernizzare gli attuali modelli, strumenti e approcci per la valutazione dell’efficacia e della tossicità dei farmaci.

Oggi siamo di fronte all’evidenza che la ricerca basata su modelli animali non costituisce un problema soltanto etico ma anche e soprattutto scientifico e metodologico. Sempre più evidenze e studi pubblicati nella letteratura scientifica internazionale mettono infatti in discussione l’affidabilità dei

modelli di ricerca tradizionali e caldeggiavano un cambio di direzione (solo per citare alcuni degli innumerevoli esempi: Khanna & Burrows 2011, Chandrasekera 2014, Coleman 2014, Van de Stolpe A. & Kauffmann 2015, Furberg e Pitt 2001, Rosenson 2004, Antman et al. 2007, Krumholz et al. 2007, Li 2008, Schreiber 2010, Holmes et al. 2011, Greek e Rice 2012, Leist et al. 2013, Prytherch e Bérubé 2014, Bunner et al. 2014, Mak et al. 2014, Lai et al. 2014, Noor 2015, Pistollato et al. 2016, Hartung 2017, Jackson e Thomas 2017).

Nel 2006 è stato stilato un documento “*FDA’s Critical Path Opportunities List*” in cui vengono descritte le criticità nel processo di sviluppo dei farmaci e si forniscono degli esempi di come le nuove scoperte nel campo della genomica, i più recenti progressi nella bioinformatica e le moderne tecnologie di *imaging*, possano essere applicate alla ricerca per migliorare l’accuratezza e l’affidabilità dei dati di efficacia e tossicità dei farmaci. (FDA 2004, <https://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/ucm076689.htm>). La necessità di focalizzare la ricerca sulla biologia umana e di utilizzare dati provenienti dalla nostra specie è stata riconosciuta come una priorità dalla comunità scientifica.

Anche con la pubblicazione, nel 2007, del rapporto “Tossicologia del XXI secolo, una visione e una strategia” da parte del NRC, Consiglio Nazionale delle Ricerche USA, è stato avviato un cambio di paradigma scientifico che prevede nuovi approcci basati sullo studio dei meccanismi molecolari di tossicità nelle cellule e nei tessuti umani (National Research Council, 2007).

Le metodologie di ricerca avanzate, in linea con il nuovo paradigma sono quindi:

- *Human based*, ovvero sono basate sull’utilizzo di dati, conoscenze e di materiale provenienti in modo etico dalla nostra specie (Coleman 2014);
- *Human relevant*, ovvero adottano tecnologie *in vitro* innovative che permettono di avvicinarsi il più possibile alle condizioni fisiologiche dell’organismo vivente;
- Prevedono un progressivo abbandono dei metodi tradizionali largamente basati sull’impiego di animali e tessuti animali;

Le metodologie di ricerca avanzate, possono essere divise in 2 grandi categorie:

- **Metodi biologici, che comprendono le colture cellulari o di tessuti umani, gli organi perfusi, gli studi in vivo non invasivi condotti in modo etico e controllato sugli esseri umani;**
- **Metodi in silico ovvero basati sull’utilizzo dell’informatica e di modelli matematici;**

Ci sono poi altre tecnologie ed approcci che trovano applicazione nella ricerca *human based*, come ad esempio *le scienze -omiche* e la biologia dei sistemi.

A loro volta tutte questi approcci possono basarsi sull’utilizzo di determinate tecnologie/metodologie che per praticità abbiamo raccolto sotto il nome di “metodi chimici, biomolecolari ed altri” e che permettono ad esempio di rilevare quantità infinitesimali di farmaci o sostanze nel corpo umano (spettrometria di massa), stampare tessuti umani in 3 dimensioni, effettuare modifiche precise e mirate del DNA delle cellule utilizzate come modelli di patologia, ecc.

Bibliografia

Antman E. M., J. S. Bennett, A. Daugherty, C. Furberg, H. Roberts and Taubert K. A., *Circulation*, 2007, 115, 1634.

Bunner, A. E. et al. Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World J Diabetes*. 2014 Apr 15;5(2):146-59. doi: 10.4239/wjd.v5.i2.146)

- Chandrasekera, P, C. Murine models of human disease: why we must think outside the mouse. (2014) Conference, Speaker Abstracts.
- Coleman, R. Human-based Systems for Translational Research. Royal Society of Chemistry, 8 dic 2014.
- Furberg C. D. and B. Pitt, *Curr Contr. Trials C*, 2001, 2, 205.
- Greek, R. & Rice, M, J. Animal models and conserved processes. *Theor Biol Med Model*. 2012 Sep 10;9:40. doi: 10.1186/1742-4682-9-40
- Hartung, T. Evolution of toxicological science: the need for change. *Int. J. Risk Assessment and Management*, Vol. 20, Nos. 1/2/3, 2017
- Hartung, T. Opinion Versus Evidence for the Need to Move Away from Animal Testing. *ALTEX*. 2017;34(2):193-200. doi: 10.14573/altex.1703291.
- Holmes, A, M. et al. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. *Drug Discov Today*. 2011 Aug;16(15-16):659-70. doi: 10.1016/j.drudis.2011.05.014. Epub 2011 Jun 23
- Jackson, S, J. & Thomas, G, J. Human tissue models in cancer research: looking beyond the mouse. *Dis Model Mech*. 2017 Aug 1;10(8):939-942. doi: 10.1242/dmm.031260.
- Khanna, R. & Burrows, S, R. Human immunology: a case for the ascent of non-furry immunology. *Immunol Cell Biol*. 2011 Mar;89(3):330-1. doi: 10.1038/icb.2010.173.
- Krumholz H. M., J. S. Ross, A. H. Presler and D. S. Egilman, *Br. Med. J.*, 2007, 334, 120.
- Lai, M. et al. You are what you eat, or are you? The challenges of translating high-fat-fed rodents to human obesity and diabetes. *Nutr Diabetes*. 2014 Sep 8;4:e135. doi: 10.1038/nutd.2014.30
- Leist M, Hartung T. Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Archives of Toxicology*. 2013;87(4):563-567. doi:10.1007/s00204-013-1038-0.
- Li, A, P. Human-Based in vitro Experimental Systems for the Evaluation of Human Drug Safety. In: Sahu, S, C. *Hepatotoxicity: From Genomics to In Vitro and In Vivo Models*. John Wiley & Sons, U.S.A., 28 feb 2008, pag. 90
- Mak, I, W. et al. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*. 2014 Jan 15;6(2):114-8. eCollection 2014)
- Noor F. A shift in paradigm towards human biology-based systems for cholestatic-liver diseases. *J Physiol*. 2015 Dec 1;593(23):5043-55. doi: 10.1113/JP271124. Epub 2015 Nov 4.
- Pistollato, F. et al. Alzheimer disease research in the 21st century: past and current failures, new perspectives and funding priorities. *Oncotarget*. 2016 Jun 28;7(26):38999-39016. doi: 10.18632/oncotarget.9175.
- Prytherch, Z. & Bérubé, K. Modelling the human respiratory system: approaches for in vitro safety testing and drug discovery. Human-derived lung models; The future of toxicology safety assessment. In: Coleman, R. *Human-based Systems for Translational Research*. Royal Society of Chemistry, 8 dic 2014 (pag. 80).
- Rosenson R. S., *Am. J. Med.*, 2004, 116, 408.
- Schreiber, SL, AF Shamji, PA Clemons et al. (2010) Towards patient-based cancer therapeutics. *Nat Biotech* 28:904-906.
- Van de Stolpe A. & Kauffmann R. H. (2015). Innovative human-specific investigational approaches to autoimmune disease. *RSC Adv.* 5. 10.1039/C4RA15794J.

1. Metodi biologici

Tra i metodi biologici i più importanti sono sicuramente le colture cellulari umane tridimensionali (3D) e le colture di tessuti umani. Negli organismi viventi le cellule crescono nelle 3 dimensioni, immerse in una matrice extracellulare e a contatto con altre cellule. Per questo motivo le colture cellulari tradizionali in monostrato e aderenti alla plastica non rappresentano una situazione realistica dal punto di vista fisiologico. Le cellule cambiano ad esempio la loro forma, l'espressione di determinati geni e quindi rispondono in modo diverso agli stimoli ambientali. Le moderne tecnologie permettono di far crescere le cellule nelle 3 dimensioni, sia in sospensione che su speciali supporti (*scaffolds*) e di ottenere delle condizioni molto più vicine a quelle fisiologiche che si trovano nei tessuti del corpo umano (Antoni et al. 2015).

In biologia si definisce tessuto un insieme di cellule strutturalmente simili, associate per funzione. Costituisce un livello superiore di organizzazione cellulare, deputato a svolgere un ruolo determinante all'interno di un organismo.

I tessuti umani possono essere ricostituiti *in vitro* a diversi gradi di complessità a partire da cellule umane prelevate direttamente dai pazienti.

Questi tessuti prendono il nome di “tessuti umani ricostituiti” *in vitro* e permettono di effettuare un gran numero di studi sia per la ricerca di base che applicata alla farmacologia.

Esempi di tessuti ricostituiti in 3 dimensioni sono l'epidermide (ad es. Netzlaff et al. 2005, Straticell), l'epitelio corneale, orale e gengivale, l'epitelio vaginale, delle vie respiratorie (ad es. Onchoteis, Behrsing et al. 2017, Czekala et al. 2018, Mattek).

Grazie alle nuove tecnologie come le biostampanti tridimensionali oggi è possibile “stampare” dei tessuti umani a diversi gradi di complessità, come ad esempio il miocardio del cuore, utilizzando le cellule umane come bio-inchiostri (Kuss e Duan 2017). Ciò permette anche di superare il limite della relativa scarsa reperibilità di tessuti umani freschi.

1.2. Gli organoidi

Un esempio di coltura cellulare tridimensionale è rappresentato dagli organoidi umani. Gli organoidi sono delle versioni semplificate e miniaturizzate di organi umani fatti crescere in laboratorio. Si possono così ottenere dei mini fegati, cuori, stomaci, intestini, cervelli, ecc. per modellare le malattie e studiare gli effetti di farmaci e sostanze tossiche sull'organo in questione.

Visto che mentre si sviluppano ripercorrono *in vitro* tutte le tappe dello sviluppo embrionale, possono essere utilmente impiegati per valutare gli effetti di farmaci e sostanze o di determinate malattie sullo sviluppo d'organo.

L'esempio forse più affascinante è quello dei mini-cervelli (mini-brains), che hanno già permesso di riprodurre e studiare i meccanismi di diverse malattie. Di particolare interesse la possibilità di modellare le patologie dello sviluppo neurologico (ad es. i disturbi dello spettro autistico) (Lancaster et al. 2013, Allende et al. 2018), neurodegenerative (ad es. Alzheimer) e psichiatriche, come ad es. la schizofrenia, impossibili da studiare nei modelli animali che anche dopo tanti anni non hanno permesso di comprendere i meccanismi alla base di tali malattie tipicamente umane (Lee et al. 2017).

Gli organoidi ed altri modelli basati su colture cellulari umane, si formano a partire da cellule staminali. Le cellule staminali sono cellule “immature” in grado di differenziarsi e dare origine a diversi tipi di cellule del nostro organismo. Quando le cellule staminali sono in grado di originare tutti i tipi cellulari dell'organismo vengono chiamate “pluripotenti”. Questo tipo di cellule staminali fino a pochi anni fa poteva essere ricavato soltanto dagli embrioni ai primi stadi di sviluppo, con conseguenti problemi etici connessi alla distruzione di embrioni umani. Grazie agli scienziati giapponesi Takahashi, Yamanaka e colleghi che per questo hanno ricevuto un premio Nobel nel 2012,

oggi non è più necessario ricorrere agli embrioni per ottenere cellule staminali pluripotenti. È possibile infatti riprogrammare le cellule adulte prelevate dal derma della pelle o dal sangue, a cellule staminali pluripotenti (le così dette cellule staminali pluripotenti indotte - iPSCs) e farle diventare cellule specializzate di qualunque tessuto del corpo umano (Takahashi et al. 2007).

L'impatto sulla ricerca biomedica è notevole. Se prima la disponibilità di cellule umane come ad esempio neuroni, cellule del muscolo cardiaco, fegato, era molto limitata, oggi con le iPSCs è possibile fare qualcosa che non è mai stato possibile fare nella storia della ricerca biomedica: ottenere virtualmente tutti i tipi cellulari dallo stesso paziente. Dato che le cellule iPSCs hanno lo stesso patrimonio genetico e le stesse mutazioni dei pazienti dai quali provengono, i ricercatori possono usare le iPSCs per ricreare le malattie in laboratorio e studiare come la genetica di un paziente e le condizioni ambientali contribuiscano alla sua malattia (Hübner et al. 2017, Naphade et al. 2018). Le iPSCs permettono ai ricercatori di osservare e studiare la differenziazione cellulare - il processo attraverso il quale le cellule diventano specializzate - e cosa può andare storto nella differenziazione e causare diverse malattie (Linda et al. 2017). Le iPSCs consentono anche di ripetere gli esperimenti più volte e di ottenere una grande mole di dati in tempi relativamente brevi, condizioni necessarie per considerare affidabili e riproducibili i risultati.

Tornando agli organoidi, abbiamo quindi la possibilità di crearne a partire sia da soggetti sani che da pazienti affetti da una determinata malattia (Gabriel e Gopalakrishnan 2017).

Possiamo creare banche di organoidi. Una biobanca di organoidi consiste in una raccolta di organoidi derivati da pazienti con diverse patologie e differenti forme della stessa patologia.

Gli organoidi vengono caratterizzati attraverso il sequenziamento del DNA, il profilo di espressione genica e sensibilità a farmaci noti, al fine di creare un database che legghi le informazioni genetiche, o di altro tipo alla sensibilità a particolari farmaci. È possibile anche testare nuovi farmaci o combinazione degli stessi, esplorando nuove strategie terapeutiche. In questo modo diviene possibile suddividere i pazienti affetti da una stessa patologia (ad esempio tumore al seno) in diverse categorie in base alla sensibilità ai farmaci e permettere una terapia personalizzata (Sachs et al. 2018). Ciò è molto importante alla luce del fatto che il problema spesso non è la mancanza di una terapia ma l'impossibilità di conoscere la terapia più adatta tra le diverse opzioni possibili (<http://hub4organoids.eu/living-biobanks/>).

Bibliografia

Allende ML, Cook EK, Larman BC, Nugent A, Brady JM, Golebiowski D, Sena-Esteves M, Tiffit CJ, Proia RL. Cerebral organoids derived from Sandhoff disease-induced pluripotent stem cells exhibit impaired neurodifferentiation. *J Lipid Res.* 2018 Mar;59(3):550-563. doi: 10.1194/jlr.M081323. Epub 2018 Jan 22.

Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 11;16(3):5517-27. doi: 10.3390/ijms16035517.

Behrsing Holger P, Huang Song, and Constant Samuel. The Use of Human 3D Reconstructed Airway Cultures for Tobacco Product Evaluation: Precision Low-Volume Exposures at the Apical Site. *Applied In Vitro Toxicology.* January 2017, doi:10.1089/aivt.2016.0028.

Czekala L, Stevenson M, Simms L, et al. The use of human 3D reconstructed bronchial tissue to study the effects of cigarette smoke and e-cigarette aerosol on a wide range of cellular endpoints. *SOT 57th Annual Meeting 11 – 15th March 2018 Abstract Number 2803 Poster ID: P325*

Gabriel E, Gopalakrishnan J. Generation of iPSC-derived Human Brain Organoids to Model Early Neurodevelopmental Disorders. *J Vis Exp.* 2017 Apr 14;(122). doi: 10.3791/55372.



Hübner D, Jahn K, Pinkert S, Böhnke J, Jung M, Fechner H, Rujescu D, Liebert UG, Claus C. Infection of iPSC Lines with Miscarriage-Associated Coxsackievirus and Measles Virus and Teratogenic Rubella Virus as a Model for Viral Impairment of Early Human Embryogenesis. *ACS Infect Dis.* 2017 Dec 8;3(12):886-897.

Kuss M., Duan B. (2017) 3D Bioprinting for Cardiovascular Tissue Engineering. In: Farooqi K. (eds) *Rapid Prototyping in Cardiac Disease*. Springer, Cham

Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013 Sep 19;501(7467):373-9. doi: 10.1038/nature12517. Epub 2013 Aug 28.

Lee CT Bendriem RM, Wu WW, Shen RF. 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders. *J Biomed Sci.* 2017 Aug 20;24(1):59. doi: 10.1186/s12929-017-0362-8.

Linda K, Fiuza C, Nadif Kasri N. The promise of induced pluripotent stem cells for neurodevelopmental disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017 Nov 8. pii: S0278-5846(17)30569-9.

Mattek <https://www.mattek.com/products/>

Naphade S, Embusch A, Madushani KL, Ring KL1, Ellerby LM. Altered Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Endogenous Inhibitors in a Human Isogenic Stem Cell Model of Huntington's Disease. *Front Neurosci.* 2018 Feb 5;11:736. doi: 10.3389/fnins.2017.00736. eCollection 2017.

Netzlaff F., Lehr CM, Wertz P. & Schaefer, U. (2005). The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 60. 167-78. 10.1016/j.ejpb.2005.03.004.

Oncotheis - <http://www.epithelix.com/products/>

Sachs N et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell.* 2018 Jan 11;172(1-2):373-386.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.010. Epub 2017 Dec 7.

Straticell - <https://www.straticell.com/en/In-Vitro-Skin-Models/in-vitro-reconstituted-epidermis.php>

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

1.3. Colture dinamiche connesse: bioreattori multicompartimentali modulari ed organi su chip

Nel corpo umano le cellule sono sottoposte a 3 principali classi di stimoli:

- Stimoli strutturali;
- Stimoli meccanici dovuti al flusso e al movimento;
- Stimoli biochimici;

Gli stimoli strutturali, come accennato in precedenza, sono dati dall'architettura cellulare tridimensionale, dalle interazioni delle cellule tra loro e con la matrice extracellulare, con le proprie caratteristiche di rigidità e viscoelasticità.

Gli stimoli dovuti al flusso, sanguigno e linfatico, sono fondamentali per l'apporto di ossigeno, nutrienti, ormoni, ecc. e per la rimozione di sostanze di scarto e tossine. Gli stimoli meccanici da

movimento sono particolarmente importanti per l'omeostasi di alcuni tessuti quali ad esempio il muscolo cardiaco, il polmone e il tessuto cartilagineo.

Gli stimoli biochimici derivano dal continuo “dialogo” o *cross talk* tra tessuti ed organi che si scambiano ormoni, fattori di crescita, sostanze che fungono da segnale e servono alle cellule per comunicare anche a distanza.

Per essere fisiologicamente rilevante e predittivo, un modello *in vitro* dovrebbe replicare gli stimoli principali che agiscono sulle cellule all'interno del corpo umano (Di Nardo et al. 2011).

Le moderne tecnologie oggi ci permettono non soltanto di ottenere diverse tipologie di colture cellulari tridimensionali ma ci consentono anche di connetterle tra loro in serie o in parallelo attraverso un circuito fluidico dinamico che mima la circolazione sanguigna.

Esistono diverse tipologie di colture dinamiche connesse. Due tipici esempi sono

- gli organi su chip (*organs on a chip*)
- e i bioreattori multicompartimentali modulari (MCMB).

■ Gli *organs on a chip* sono descritti come sistemi di colture cellulari, ognuna a rappresentare un tessuto o un organo, che interagiscono tra loro a diversi livelli su un microchip, attraverso un circuito microfluidico, in condizioni strettamente controllate.

I sistemi micro- e nano-elettromeccanici hanno permesso l'integrazione di funzionalità meccaniche ed elettriche in un dispositivo microfluidico. Questi dispositivi, grazie ai sensori integrati, permettono il monitoraggio in tempo reale delle risposte cellulari agli stimoli meccanici o chimici con un controllo dell'ambiente cellulare più preciso rispetto ai metodi convenzionali (Modena et al. 2018).

Il sistema permette di mimare le interazioni tra cellule, tessuti e addirittura organi e sistemi diversi e di fornire gli stimoli meccanici, strutturali e biochimici adeguati, riproducendo a tutti i livelli ciò che accadrebbe *in vivo* (Wang et al. 2018, Shutko et al. 2017).

Sono stati integrati fino a 10 “organi” diversi in un sistema “*human on a chip*” al fine di mimare la complessità a livello di sistema e di organismo intero. Il più recente modello multiorgano è stato chiamato “fisioma umano su *chip*” (Edington et al. 2018).

Le applicazioni sono le più diverse. Pensiamo ad esempio di dover somministrare un farmaco per via orale e di volerne testare gli effetti sistemici utilizzando un sistema *su chip*. Il farmaco può essere “somministrato” attraverso il circuito, passa nel compartimento intestinale dove viene assorbito, arriva al compartimento epatico dove viene metabolizzato e si distribuisce nei vari organi bersaglio. In questo modo è possibile studiare *in vitro* ed utilizzando materiale umano, ciò che un tempo era possibile fare soltanto *in vivo*, utilizzando animali ed andando incontro ai noti problemi dovuti alle diversità biologiche e metaboliche e alla difficoltà di estrapolazione dei dati da una specie all'altra.

L'utilizzo di cellule prelevate dal singolo paziente per l'assemblaggio di *body on a chip* personalizzati – con un nome e un cognome - rappresenta l'obiettivo più affascinante della medicina del prossimo futuro: una cura su misura per ogni paziente.

Attualmente sono stati messi a punto diversi organi su *chip* tra cui ad esempio:

- Polmone (Benam et al. 2016, 2017);
- Cuore (Lind et al. 2017);
- Apparato digerente (Jalili-Firoozinezhad 2018, Lee et al. 2017);
- Rene (Lee e Kim 2018);
- Cervello (Pamies et al. 2014);
- Sistema vascolare (Barrile et al. 2018);
- Modello di progressione tumorale e metastasi (Pradhan et al. 2018);
- Barriera emato-encefalica (Jeong et al. 2018);
- Placenta (Lee et al. 2016);
- Midollo osseo (Marturano_Kruik 2018);

Ad esempio il polmone su *chip* è il frutto della combinazione delle più moderne tecniche di microfluidica e ingegneria tissutale e costituisce un sistema *in vitro* in grado di mimare la biologia (sia in termini biochimici che meccanici) del polmone umano *in vivo*.

Si tratta di un dispositivo di microfluidica realizzato su una micro-lastra di vetro trasparente e costituito da tre micro-canali paralleli. Quello centrale è separato in due metà, inferiore e superiore, da una membrana porosa, sui due lati della quale si trovano due strati di cellule umane, rispettivamente cellule endoteliali dei capillari e cellule di rivestimento degli alveoli polmonari. Metà canale dunque funziona da via aerea e metà da vaso sanguigno e le due vie sono in stretta adesione tra loro, proprio come accade nei polmoni veri. I due canali laterali hanno invece una funzione meccanica e servono a simulare i movimenti respiratori quando nel dispositivo viene creato il vuoto. Il sistema è stato testato provando a riprodurre gli effetti che si verificano *in vivo* (sull'uomo) dopo somministrazione di IL-2. L' IL-2 è una molecola segnale naturalmente prodotta da alcuni tipi di cellule ed è utilizzata come chemioterapico nel trattamento di alcuni tumori e che può provocare edema polmonare come importante effetto avverso. Quando nel "vaso sanguigno" del *chip* è stata introdotta IL-2 in quantità paragonabili a quelle usate in ambito clinico, è stata osservata, come atteso, la comparsa di fluido e coaguli nella via aerea, similmente a quanto avviene *in vivo*. Inoltre, è stato osservato che questo effetto diventa ancora più marcato quando il dispositivo mima i movimenti respiratori. Ciò ha permesso anche di comprendere i meccanismi patogenetici alla base del problema ed all'identificazione di potenziali terapie (Huh et al. 2012).

Un modello più recente di polmone su *chip* mima anche il sistema dei capillari polmonari. Attraverso tale modello e con l'aggiunta di sangue intero umano è stato possibile modellare la trombosi polmonare similmente a quanto avviene *in vivo*. È inoltre stato possibile comprendere il meccanismo attraverso cui una tossina batterica (LPS) è in grado di promuovere la trombosi polmonare. Il modello si è dimostrato valido per valutare l'effetto di nuovi agenti terapeutici. Si tratta soltanto di un esempio.

Degna di nota è l'avveniristica biotecnologia messa recentemente a punto dai ricercatori del Wyss Institute della Harvard University, che permette di studiare la malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD). Integrando un dispositivo che inala fumo di sigaretta con un altro dispositivo che simula il tratto respiratorio umano su *chip*, i ricercatori sono riusciti a ricreare con maggiore accuratezza alcune delle caratteristiche patologiche osservate negli esseri umani. Tale sistema integrato può offrire indagini e approfondimenti scientifici non ottenibili dai modelli murini solitamente impiegati in tale genere di studi (Benam et al. 2017, Wyss Institute <https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/>).

■ Un altro esempio di colture cellulari dinamiche connesse è dato dai Bioreattori Multicompartimentali, Modulari (MCMB). A differenza dei sistemi su *chip*, questi supporti biotecnologici sono relativamente più semplici da utilizzare e meno costosi ma allo stesso tempo permettono di allestire modelli *human based* rilevanti per la ricerca.

Grazie alla presenza di un circuito fluidico e di una pompa peristaltica, i MCMB permettono l'interazione dinamica tra colture e co-culture cellulari (tridimensionali o bidimensionali), alloggiata in camere o moduli separati, collegati tra loro. Come per i sistemi su *chip* descritti in precedenza, ogni modulo rappresenta un organo del corpo umano e connettendo i moduli tra loro in serie o in parallelo attraverso un circuito fluidico è possibile modellare l'interazione fra organi e sistemi similmente a quanto accadrebbe *in vivo* (Vozzi et al. 2011).

Anche questi sistemi consentono, ad esempio, di simulare *in vitro* gli effetti sistemici di una determinata patologia, e studiare in modo specifico la risposta dei tessuti malati alle diverse terapie farmacologiche e di estrapolare dei risultati pertinenti alla biologia umana (Ucciferri et al. 2014). Ogni organo o tessuto ha bisogno del suo specifico ambiente, per questo motivo sono state sviluppate

diverse tipologie di bioreattore, ognuna dedicata a un singolo tipo cellulare: ad esempio bioreattori per il tessuto cardiaco, che riescono a mimare e ricreare il battito del cuore (Giusti et al. 2013), per il tessuto cartilagineo (De Maria et al. 2011). I bioreattori possono simulare anche le barriere fisiologiche (intestino, barriera emato-encefalica, epidermide) e permettono di testare ad esempio l'effetto sistemico di un farmaco somministrato per via orale e metabolizzato dal fegato (Giusti et al. 2014, Vinci et al. 2011).

Le barriere fisiologiche vengono simulate attraverso un particolare tipo di bioreattore che contiene un inserto atto a ospitare una membrana semi-permeabile.

I bioreattori vengono assemblati tra loro in varie configurazioni, seguendo dei metodi allometrici che correlano matematicamente quantità non lineari come la massa di un organo, il flusso sanguigno, il tempo di ritenzione del sangue ed il tasso metabolico (Mazzei et al. 2011).

Esempi di applicazioni dei MCMB

- Sviluppo di farmaci;
- Medicina rigenerativa;
- Studi di tossicità e valutazione della sicurezza (Sbrana e Ahluwalia 2012);
- Studi di assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione (ADME), biotrasformazione e scambio di gas;
- Modelli di malattie. Modelli in vitro di malattie, come il glaucoma o l'ipertensione, possono essere creati all'interno del sistema grazie alle variazioni di pressione e di flusso applicabili ai tessuti;
- Ricerca sulle cellule staminali

(Kirkstall <http://www.kirkstall.com/>)

I MCMB hanno già permesso di replicare i meccanismi del diabete di tipo 2: sono stati coltivati insieme tre tipi di cellule derivanti da altrettanti tessuti attivi e responsivi al metabolismo di substrati energetici e molecole secondarie (cellule da tessuto epatico, tessuto adiposo e cellule da tessuto endoteliale). Le cellule e i tessuti, posti nelle camere comunicanti dei bioreattori e collegati grazie al flusso di un mezzo di coltura comune, sono stati sottoposti a condizioni simulanti sia stati fisiologici che patologici post-prandiali (ad es. normo- e iperglicemia da alimentazione). I risultati hanno dimostrato che una coltura multipla di tessuti collegati secondo schemi razionali e in scala allometrica, può simulare e riassumere (in maniera semplificata) molte delle alterazioni caratteristiche del metabolismo umano in sovraccarico nutrizionale, come ad esempio l'infiammazione sistemica e danno vascolare.

Il sistema ha risposto infatti come il corpo umano, mostrando gli stessi segni di danno che compaiono al livello sistemico e nel tessuto vascolare in presenza della malattia.

Ricordiamo a questo proposito che i modelli animali di diabete non sono in grado di ricapitolare adeguatamente la malattia umana (Ali et al. 2018, Chandrasekera & Pippin 2013).

I risultati della ricerca, pubblicati sulla rivista PLoS ONE (Iori et al. 2012) sono di grande rilievo non solo per lo studio delle malattie dismetaboliche (tra cui l'obesità), ma anche per le sue potenziali applicazioni allo studio di altre patologie e quindi alla realizzazione di nuovi modelli fisiopatologici.

Bibliografia

Ali, Z. et al. Animal Research for Type 2 Diabetes Mellitus, Its Limited Translation for Clinical Benefit, and the Way Forward. *Altern Lab Anim.* Mar 2018.

Barrile et al. Organ-on-Chip Recapitulates Thrombosis Induced by an anti-CD154 Monoclonal Antibody: Translational Potential of Advanced Microengineered Systems. *Clin Pharmacol Ther.* 2018 Feb 27.



- Benam KH, Königshoff M, Eickelberg O. Breaking the In Vitro Barrier in Respiratory Medicine: Engineered Microphysiological Systems for COPD and Beyond. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Dec 20. doi: 10.1164/rccm.201709-1795PP. [Epub ahead of print]
- Benam, K, H. et al. Matched-Comparative Modeling of Normal and Diseased Human Airway Responses Using a Microengineered Breathing Lung Chip. *Cell Syst.* 2016 Nov 23;3(5):456-466.e4. doi: 10.1016/j.cels.2016.10.003. Epub 2016 Oct 27.
- Chandrasekera, P, C. & Pippin, J, J. (2013). Of rodents and men: species-specific glucose regulation and type 2 diabetes research. *ALTEX.* 2014;31(2):157-76.
- De Maria C, Giusti S, Mazzei D, Crawford A, Ahluwalia A. Squeeze pressure bioreactor: a hydrodynamic bioreactor for noncontact stimulation of cartilage constructs. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 Jul;17(7):757-64.
- Di Nardo, P.; Minieri, M.; Ahluwalia, A. Engineering the Stem Cell Niche and the Differentiative Micro- and Macroenvironment: Technologies and Tools for Applying Biochemical, Physical and Structural Stimuli and Their Effects on Stem Cells. In *Stem Cell Engineering*; Springer: Heidelberg, Germany, 2011; pp. 41–59.
- Edington CD et al. Interconnected Microphysiological Systems for Quantitative Biology and Pharmacology Studies. *Sci Rep.* 2018 Mar 14;8(1):4530. doi: 10.1038/s41598-018-22749-0.
- Giusti S., T. Sbrana, M. La Marca, V. Di Patria, V. Martinucci, A. Tirella, C. Domenici, A. Ahluwalia. “A novel dual-flow bioreactor simulates increased fluorescein permeability in epithelial tissue barriers” , *Biotech J*, 2014 Apr 23
- Huh D, Leslie DC, Matthews BD, Fraser JP, Jurek S, Hamilton GA, Thorneloe KS, McAlexander MA, Ingber DE. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med.* 2012 Nov 7;4(159):159ra147. doi: 10.1126/scitranslmed.3004249.
- Iori E, Vinci B, Murphy E, Marescotti MC, Avogaro A, Ahluwalia A. Glucose and fatty acid metabolism in a 3 tissue in-vitro model challenged with normo- and hyperglycaemia. *PLoS One.* 2012;7(4):e34704.
- Jalili-Firoozinezhad S et al. Modeling radiation injury-induced cell death and countermeasure drug responses in a human Gut-on-a-Chip. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 14;9(2):223. doi: 10.1038/s41419-018-0304-8.
- Jeong S, Kim S, Buonocore J, Park J, Welsh CJ, Li J, Han A. A Three-Dimensional Arrayed Microfluidic Blood-Brain Barrier Model With Integrated Electrical Sensor Array. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2018 Feb;65(2):431-439. doi: 10.1109/TBME.2017.2773463.
- Lee DW, Ha SK, Choi I, Sung JH. 3D gut-liver chip with a PK model for prediction of first-pass metabolism. *Biomed Microdevices.* 2017 Nov 7;19(4):100. doi: 10.1007/s10544-017-0242-8.
- Lee J, Kim S. Kidney-on-a-Chip: a New Technology for Predicting Drug Efficacy, Interactions, and Drug-induced Nephrotoxicity. *Curr Drug Metab.* 2018 Mar 8. doi: 10.2174/1389200219666180309101844.
- Lee JS, Romero R Han YM, Kim HC Kim CJ, Hong JS, Huh D. Placenta-on-a-chip: a novel platform to study the biology of the human placenta. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(7):1046-54. doi: 10.3109/14767058.2015.1038518. Epub 2015 Jun 15.
- Lind JU, Yadid M, Perkins I, O'Connor BB, Eweje F, Chantre CO, Hemphill MA, Yuan H, Campbell PH, Vlassak JJ, Parker KK. Cardiac microphysiological devices with flexible thin-film sensors for higher-throughput drug screening. *Lab Chip.* 2017 Oct 25;17(21):3692-3703. doi: 10.1039/c7lc00740j.



- Marturano-Kruik A1, Nava MM, Yeager K, Chramiec A, Hao L, Robinson S, Guo E, Raimondi MT, Vunjak-Novakovic G. Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Feb 6;115(6):1256-1261. doi: 10.1073/pnas.1714282115. Epub 2018 Jan 23.
- Mazzei D., Giusti, S., Sbrana, T., and Ahluwalia, A., “Multi-Compartmental Modular Bioreactor as Innovative System for Dynamic Cell Cultures and Co-Cultures”, in *Bioreactors: Design, Properties and Applications*, P. G. Antolli and Liu, Z. Nova Science Publishers, Inc, 2011, pp. 159 - 178.
- Modena MM, Chawla K, Misun PM, Hierlemann A. Smart Cell Culture Systems: Integration of Sensors and Actuators into Microphysiological Systems. *ACS Chem Biol*. 2018 Feb 15.
- Pamies D, Hartung T, Hogberg HAT Biological and medical applications of a brain-on-a-chip. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014 Sep;239(9):1096-1107.
- Pradhan S, Smith AM, Garson CJ, Hassani I, Seeto WJ, Pant K, Arnold RD, Prabhakarandian B, Lipke EA. A Microvascularized Tumor-mimetic Platform for Assessing Anti-cancer Drug Efficacy. *Sci Rep*. 2018 Feb 16;8(1):3171. doi: 10.1038/s41598-018-21075-9.
- Sbrana T, Ahluwalia A. Engineering Quasi-Vivo in vitro organ models. *Adv Exp Med Biol*. 2012;745:138-53. doi: 10.1007/978-1-4614-3055-1_9.
- Shutko AV, Gorbunov VS, Guria KG, Agladze KI. Biocontractile microfluidic channels for peristaltic pumping. *Biomed Microdevices*. 2017 Aug 9;19(4):72. doi: 10.1007/s10544-017-0216-x.
- Ucciferri N, Sbrana T, Ahluwalia A. Allometric Scaling and Cell Ratios in Multi-Organ in vitro Models of Human Metabolism. *Front Bioeng Biotechnol*. 2014 Dec 17;2:74.
- Vinci B, Duret C, Klieber S, Gerbal-Chaloin S, Sa-Cunha A, Laporte S, Suc B, Maurel P, Ahluwalia A, Daujat-Chavanieu M. Modular bioreactor for primary human hepatocyte culture: medium flow stimulates expression and activity of detoxification genes. *Biotechnol J*. 2011 May;6(5):554-64.
- Vozzi F, Mazzei D, Vinci B, Vozzi G, Sbrana T, Ricotti L, Forgione N, Ahluwalia A. A flexible bioreactor system for constructing in vitro tissue and organ models. *Biotechnol Bioeng*. 2011 Sep;108(9):2129-40.
- Wang, Y, I. et al. Multiorgan Microphysiological Systems for Drug Development: Strategies, Advances, and Challenges. *Adv Healthc Mater*. 2018 Jan;7(2). doi: 10.1002/adhm.201701000. Epub 2017 Dec 4.
- Wyss Institute <https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/>

1.4. L’UOMO COME MODELLO SPERIMENTALE

L’uomo è considerato il modello sperimentale ideale per lo studio delle patologie umane. È evidente che lo studio sperimentale dell’uomo è fortemente limitato da considerazioni di ordine etico. Per esempio, ricerche di carattere fisiologico da effettuarsi nel volontario sano hanno necessariamente limiti che sono rappresentati dalla non invasività delle metodiche di studio o dalla ragionevole mancanza di tossicità associata a eventuali trattamenti farmacologici. È possibile anche effettuare studi di tipo sperimentale su pazienti affetti da malattie diverse, sia a scopo conoscitivo sia a scopo terapeutico. Anche in questo caso esistono necessariamente limiti etici molto precisi e regole molto restrittive, che sono codificate e vengono applicate a qualsiasi protocollo clinico di studio mirato, per esempio, allo sviluppo di nuovi farmaci. Tutti i protocolli sperimentali relativi all’uomo devono essere approvati da comitati etici che decidono riguardo la fattibilità e l’eticità degli studi proposti. Esempi di studi *in vivo* praticabili sull’uomo sono gli studi clinici, lo studio del cervello e di altri organi attraverso tecniche di *imaging*.



Gli studi clinici e lo sviluppo di nuovi farmaci

Successivamente alla fase di sperimentazione pre-clinica di un candidato farmaco - *in silico*, *in vitro*, *in vivo* su animali – (quest'ultima ancora obbligatoria per legge), seguono gli studi clinici su soggetti umani, ovvero la fase clinica. La fase clinica a sua volta prevede più fasi: Fase I, II, III e IV.

La Fase I prevede, a parte l'eccezione, a volte, in campo oncologico e per l'HIV, in cui possono essere volontari malati, la sperimentazione su volontari sani. Si studiano gli effetti collaterali e la tossicità della molecola in esame su persone perfettamente sane che accettano volontariamente di sottoporsi alla sperimentazione. Questa fase di studio è la fase più delicata, in quanto espone i volontari ad un certo rischio per la loro salute, tanto più grande quanto meno affidabili e predittivi sono i modelli sperimentali utilizzati negli studi preclinici.

Nello studio di Fase II, definito anche terapeutico-esplorativo, si indaga su volontari malati, l'attività terapeutica della sostanza in esame, e si cerca di definire quale potrà essere la dose migliore. Lo studio viene condotto dividendo i pazienti in due gruppi a ciascuno dei quali è somministrata una dose differente di farmaco e quando eticamente possibile, un placebo (una sostanza senza alcuna attività terapeutica). Per evitare che la somministrazione del placebo influenzi i risultati della ricerca, le valutazioni vengono condotte senza che il paziente (studio in singolo cieco) o sia il medico che il paziente (doppio cieco) conoscano il tipo di trattamento.

Si passa quindi alla Fase III o terapeutico-confermativo. Questa fase è simile alla precedente, ma il numero dei pazienti arruolati nella ricerca è di centinaia o anche migliaia. In questo caso l'efficacia della sostanza in studio sui sintomi, sulla qualità della vita o sulla sopravvivenza è confrontata con il placebo o con altri farmaci già in commercio. Anche in questa fase vengono controllate frequenza e gravità degli effetti collaterali e lo studio può durare da 3 a 5 anni. Le molecole che in questa fase si dimostrano essere efficaci e non pericolose, ottengono quindi le dovute autorizzazioni alla commercializzazione.

L'ultima fase della ricerca è la Fase IV o fase Post Marketing o Farmacovigilanza. Il farmaco è già in commercio e viene tenuto sotto osservazione, si tratta in altre parole di una fase di sorveglianza, di un sistema di monitoraggio permanente in cui si valutano le reazioni avverse, anche le più rare, quelle che nelle fasi precedenti non si sono evidenziate, ma che con l'uso di massa nella popolazione possono emergere.

Lo sviluppo di nuovi farmaci ad uso umano è necessario per molte condizioni patologiche che oggi non sono ancora curabili ma purtroppo si tratta di un'attività lunga, complessa e costosa, con un'alta percentuale di fallimento.

Microdosing in Fase 0

Una delle caratteristiche più importanti di un candidato farmaco è il suo profilo farmacocinetico, ovvero il modo in cui il farmaco viene assorbito, distribuito, metabolizzato ed escreto dall'organismo umano. Purtroppo i dati farmacocinetici forniti dai modelli preclinici tradizionali, che siano *in vitro* o *in vivo* (modelli animali) spesso non sono affidabili, in quanto non rilevanti per la biologia umana. Non a caso, la maggiore causa di fallimento nello sviluppo dei farmaci viene attribuita all'incapacità di ottenere precocemente dati farmacocinetici rilevanti per l'uomo. Concentrazioni troppo basse di farmaco a livello dell'organo target, per un tempo troppo breve, possono essere causa di inefficacia mentre concentrazioni troppo elevate, per un tempo troppo lungo, potrebbero indurre effetti tossici.

Un approccio sperimentale utile a superare tali problemi è il così detto *microdosing*.

In sintesi consiste nella somministrazione a volontari sani di dosi estremamente piccole, non attive farmacologicamente, di un determinato farmaco per stabilirne il profilo farmacocinetico nell'uomo.

Il *microdosing* può essere applicato prima dell'inizio della Fase I degli studi clinici (la Fase 0) e si basa su tecnologie analitiche ultrasensibili capaci di misurare quantità e concentrazioni infinitesimali (dell'ordine del picogrammo o del femtogrammo) di farmaco e di metaboliti. Le tecnologie più

utilizzate a questo scopo sono la cromatografia liquida in associazione con la spettrometria di massa in tandem, la spettrometria di massa ultrasensibile con acceleratore e la tomografia ad emissione di positroni (PET). Illustreremo brevemente nei prossimi capitoli cosa sono queste tecnologie e quali potrebbero essere le loro applicazioni nella ricerca *human based*.

Il *microdosing* non solo permette di selezionare il miglior candidato farmaco da inserire nella prima fase clinica, ma anche di determinare la dose iniziale di farmaco da somministrare ai volontari (Seymour 2009, Garner e Lappin 2006, Garner 2005). Si tratta di un approccio *human based* predittivo e rilevante le cui applicazioni spaziano dagli studi farmacocinetici già accennati agli studi della farmacodinamica, ovvero di come agisce il farmaco sull'organismo umano a livello biochimico e fisiologico, localizzazione del farmaco nei tessuti bersaglio, interazione tra più farmaci, valutazione dei suoi effetti nelle popolazioni più vulnerabili, ad es. i bambini, minimizzando i rischi.

L'utilizzo delle tecniche analitiche in combinazione aumentano la versatilità dei disegni sperimentali ed il valore e l'affidabilità dei dati ottenuti dagli studi di *microdosing* (Burt et al. 2017).

Tecniche di *imaging* (a cura di Valentina Marchi)

Con questa terminologia si fa riferimento a diverse tecniche che vengono utilizzate per l'ottenimento o la produzione di immagini.

Si tratta di tecniche non invasive che permettono la visualizzazione e l'analisi *in vivo* sull'uomo degli organi e dei processi fisiologici e fisiopatologici associati allo stato di normalità e a quello di malattia. Sono molto utilizzate in diagnostica e nel campo della ricerca possono trovare impiego soprattutto nello studio del cervello (*neuroimaging*) ed in farmacologia.

Oltre a informazioni morfo-strutturali, le tecniche di *imaging* possono fornire anche dati funzionali. Per più di 50 anni la diagnostica per immagini in ambito medico si è basata su radiografia e radioscopia: più recentemente nuove invenzioni hanno rivoluzionato questo comparto con l'introduzione dell'ecografia, della medicina nucleare e della tomografia computerizzata (la prima tecnica di *imaging* assistita dal computer). Sono state poi introdotte le tecniche tomografiche di medicina nucleare PET (Positron Emission Tomography) e SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), la risonanza magnetica (RM) e la risonanza magnetica funzionale (fMRI).

Le metodiche attualmente considerate di livello avanzato e che possono trovare impiego nella ricerca *human based* sono soprattutto la risonanza magnetica funzionale (fMRI) e la tomografia a emissione di positroni (PET), che descriveremo brevemente illustrando degli esempi di applicazioni.

Attraverso le tecniche di *imaging* avanzate è possibile ad esempio:

- Attribuire determinate attività a specifiche regioni cerebrali e ricostruire così un'anatomia di tipo funzionale, oltre che topografica;
- Individuare circuiti neuronali complessi, formati da aree cerebrali diverse che lavorano in rete;
- Visualizzare aree cerebrali ipo- o iper- funzionanti correlate a stati di anomalia biologica o a stati di attività cerebrale durante lo svolgimento di compiti complessi;

Molti studi hanno riportato risultati soddisfacenti nel determinare se specifiche anomalie del sistema nervoso centrale (SNC) possono essere correlate all'insorgenza di determinate malattie. L'*imaging* è risultato promettente anche per lo studio di alcune malattie psichiatriche: aree quali l'ippocampo e diverse zone della corteccia, il cervelletto e il corpo calloso sono coinvolte nella schizofrenia, patologia invalidante caratterizzata da una serie di disturbi, molti dei quali cognitivi. Vista l'implicazione di importanti circuiti cerebrali, è nata l'ipotesi secondo la quale, la schizofrenia sia associata a un alterato sviluppo del SNC: modificazioni cerebrali sono state osservate prima dell'esordio della malattia e prima del trattamento con antipsicotici (Kotrla & Weinberger 1995, Shenton & Kubicki 2009, Venkatasubramanian 2007).



Grazie al *neuroimaging* è stata osservata una ridotta attività metabolica in specifiche regioni del cervello ed un elevato metabolismo in altre aree cerebrali in pazienti affetti dalla Sindrome di Tourette; studi PET hanno inoltre mostrato una ipo-perfusione sanguigna in alcune aree limbiche, con un aumento di metabolismo in aree contigue.

Molti studi di *brain-Imaging* hanno permesso di evidenziare una serie di correlati neurobiologici presenti nei disturbi dell'Umore e nei disturbi d'Ansia. In particolare, è stata messa in evidenza una marcata riduzione del volume dell'ippocampo nei soggetti affetti da queste patologie (Sheline et al, 2003).

Le tecniche di *imaging* rappresentano un metodo valido per esplorare le basi genetiche nelle differenze dei comportamenti complessi e nella vulnerabilità individuale alle malattie sia neurologiche che psichiatriche, al punto da prospettarsi come uno strumento fondamentale per capire la neurobiologia del comportamento umano, grazie ai collegamenti tra genetica, neurochimica, neuroanatomia e neuropatologia.

Negli ultimi anni le tecniche di *neuroimaging* sono diventate fondamentali per lo studio delle dipendenze; l'assunzione di sostanze psicoattive rappresenta un grave rischio per l'integrità delle capacità neuro-psichiche e del sistema nervoso centrale, in quanto modificano il funzionamento delle principali capacità cerebrali agendo su quelle molecole che fungono da messaggeri nel nostro sistema nervoso (i neuro-trasmittitori), determinando così gravissime conseguenze. Lo studio del cervello di chi utilizza sostanze stupefacenti ha messo in luce gli effetti nocivi, anche permanenti, sullo sviluppo e sul funzionamento delle funzioni cerebrali; le tecniche di *imaging* oltre a visualizzare sede ed estensione del danno, consentono di misurare l'impatto che le sostanze psicoattive hanno sui processi mentali e sull'attività cerebrale.

Pertanto, tali tecniche rappresentano strumenti utili per conoscere i meccanismi neurali della dipendenza e delle sue conseguenze portando a terapie e cure più adeguate (Zoccatelli et al. 2012).

Le tecniche di *imaging* hanno contribuito in modo determinante alla comprensione del funzionamento del cervello umano, svelando meccanismi legati a processi sensoriali e motori, ma anche a processi più complessi quali funzioni esecutive, memoria e linguaggio. I paradigmi sperimentali classici consentono di associare la funzione studiata con l'attivazione di una o più aree del cervello.

Lo sviluppo di tecniche non convenzionali permette di utilizzare le tecniche di *imaging* anche per lo studio delle comunicazioni fra le aree cerebrali. Questo ha contribuito ad ampliare le conoscenze sul funzionamento del cervello, passando da una nozione basata su associazioni univoche tra funzioni e aree cerebrali a una concezione dinamica in cui la stessa area può partecipare a diverse funzioni in dipendenza delle altre aree con cui di volta in volta si connette funzionalmente.

Un'altra importantissima applicazione delle tecnologie di *imaging* è la farmacologia, in quanto attraverso tali tecniche, in particolare la PET, si possono ottenere preziose informazioni sulla distribuzione tridimensionale ed attività delle molecole farmacologiche in modo non invasivo nel corpo umano (Nye e Howell 2016, Honey e Bullmore 2007).

Risonanza magnetica nucleare (RMN) e risonanza magnetica funzionale (fMRI)

La Risonanza magnetica nucleare (RMN) è una tecnica non invasiva che si fonda sul principio delle onde radio, si avvale delle tecniche di diagnostica per immagini e non ha praticamente limiti nei suoi campi di applicazione.

La RMN acquisisce le immagini di tipo topografico digitale in tre dimensioni, sagittale, trasversale o dorsale; quando si procede alla valutazione dell'immagine RM si tiene conto degli aspetti morfologici (forma, dimensioni, margini e posizione), dell'intensità del segnale e dell'estensione dell'area di interesse o della lesione.

La risonanza magnetica funzionale, (fMRI, da Functional Magnetic Resonance Imaging), è una tecnica che consiste nell'uso dell'*imaging* a risonanza magnetica per valutare la funzionalità di un organo o un apparato, in maniera complementare all'*imaging* morfologico. Sebbene 'risonanza magnetica funzionale' sia una terminologia generica, ovvero applicabile a qualsiasi tecnica di *imaging* a risonanza magnetica che dia informazioni aggiuntive rispetto alla semplice morfologia (ad esempio *imaging* metabolico, quantificazione del flusso sanguigno, ecc.), essa è spesso usata come sinonimo di 'risonanza magnetica funzionale neuronale', una delle tecniche di *neuroimaging* funzionale di sviluppo più recente.

Questa tecnica è in grado di visualizzare la risposta emodinamica (cambiamenti nel contenuto di ossigeno del parenchima e dei capillari) correlata all'attività neuronale del cervello o del midollo spinale nell'uomo.

Studi con fMRI che hanno investigato le capacità decisionali in soggetti consumatori di amfetamine durante l'astinenza prolungata hanno mostrato una differenza di attivazione cerebrale nei soggetti che non riescono a mantenere l'astinenza. Altri studi hanno riportato anomalie funzionali nei neurotrasmettitori dopaminergici, anche dopo un lungo periodo di cessazione dell'assunzione di sostanze stupefacenti (Parvaz et al. 2001). È stata inoltre dimostrata un'alterazione metabolica cerebrale collegata ad alterazioni funzionali che continuano nel tempo: l'effetto neurotossico delle droghe continua anche quando si smette di assumere sostanze ed è necessario tanto tempo prima che la funzionalità cerebrale torni ai valori normali (Zoccatelli et al. 2012).

Ancora, è stato scoperto che l'uso di droghe è associato a un'anomala e alterata organizzazione delle funzioni del cervello: soggetti che usano abitualmente eroina mostrano una significativa riduzione di glutammato, una molecola implicata nella capacità di giudizio, oltre a una riduzione del volume del cervello, indice di atrofia cerebrale, in aree adibite alla capacità di apprendere, memorizzare e elaborare emozioni (Zoccatelli et al. 2012). Da questi brevi accenni sugli effetti tossici dalla droga, risulta chiaro come le tecniche di *neuroimaging* possano essere utili a livello clinico, nello studio delle dipendenze da sostanze d'abuso.

Le tecniche di *imaging* possono trovare applicazione anche nella comprensione dei meccanismi neurofisiologici implicati nella malattia di Alzheimer (AD) e in altre demenze. Grazie all'*imaging* è stato possibile stabilire che esiste una lunga fase sub-clinica durante la quale possono essere rilevati gli effetti patologici dell'AD, inoltre, le tecniche di risonanza sono in grado di definire le aree cerebrali colpite dalla malattia (Johnson et al. 2012). Nella demenza fronto-temporale (FTD), un altro tipo di demenza, la fMRI ha rivelato un pattern unico di atrofia cerebrale (Tartaglia et al. 2011).

Tomografia a emissione di positroni (PET)

La PET è uno strumento che si avvale della misurazione delle variazioni di metabolismo e di flusso sanguigno per visualizzare le aree attive degli organi del corpo umano, compreso il cervello. Il cervello consuma circa il 20% di glucosio e ossigeno utilizzato dal corpo; le aree cerebrali con cellule nervose attive usano di più il glucosio e l'ossigeno rispetto alle aree non attive: per rispondere alle richieste delle aree attive, il flusso sanguigno dell'area aumenta. La rilevazione di queste variazioni di metabolismo e di flusso sanguigno sono alla base della PET (Purves et al. 2009).

Con la PET si ottengono mappe dei processi funzionali che avvengono all'interno del corpo. Alcuni strumenti, come ad es. la RMN che abbiamo menzionato prima, permettono di identificare alterazioni organiche e anatomiche, la PET è invece capace di rilevare alterazioni a livello biologico-molecolare, che a volte precedono l'alterazione anatomica. Con una scansione PET è possibile visualizzare e quantificare con discreta precisione le variazioni di flusso sanguigno nelle varie strutture anatomiche, inoltre è possibile produrre immagini relative alla concentrazione e alla distribuzione nell'organismo di particolari molecole radioattive chiamate radiofarmaci, preventivamente somministrate al paziente.

La PET trova applicazione negli studi clinici come una delle tecnologie a supporto degli studi di *microdosing* (Stenström K et al. 2010). Dosi molto piccole del farmaco legato ad un tracciante radioattivo vengono somministrate al volontario per effettuare studi di farmacodinamica e farmacocinetica (Wagner e Langer 2011).

Stimolazione magnetica trans-cranica (TMS)

La TMS non è una tecnica di *imaging* ma una tecnica di stimolazione non invasiva che trova però ugualmente impiego negli studi *in vivo* su soggetti umani.

Negli ultimi anni sono stati messi a punto interventi neurofisiologici basati sulla stimolazione magnetica o elettrica del cervello per favorire il recupero funzionale di pazienti con lesione cerebrale. Queste metodologie, come ad es. la stimolazione magnetica trans-cranica (TMS) vengono impiegate principalmente in campo terapeutico ma hanno grandi potenzialità anche nel campo della ricerca *human based* nello studio delle relazioni fra aree cerebrali, processi cognitivi e processi comportamentali, nella comprensione delle malattie neurologiche e psichiatriche, dipendenze, ecc.

La TMS è una tecnica di neuro stimolazione che modula l'attività neuronale in maniera non invasiva; fa uso di campi magnetici transienti erogati sullo scalpo mediante una bobina (*coil*) che eccita i neuroni sottostanti alla stimolazione. I principi di funzionamento della TMS si basano sulla legge di induzione elettromagnetica di Faraday, secondo cui il passaggio di un breve impulso di corrente elettrica ad alta intensità attraverso un *coil* genera un campo magnetico con linee di flussi che si propagano perpendicolarmente rispetto al piano del *coil* ed è in grado di indurre una corrente in un secondo conduttore posto nelle vicinanze. Nel caso della TMS, il primo conduttore è rappresentato dal *coil* posto sullo scalpo, mentre il secondo conduttore è rappresentato dal cervello; il campo magnetico può attraversare lo scalpo generando una corrente nel tessuto nervoso sottostante al *coil*, influenzando i neuroni.

Negli ultimi vent'anni è divenuto possibile modulare il funzionamento cerebrale in modo sicuro e reversibile. La TMS è diventata uno strumento importante nello studio delle neuroscienze cognitive. Scegliendo parametri di stimolazione differenti, questa metodica può facilitare o interferire con i processi cognitivi. Con la TMS è possibile indagare il contributo di diverse aree corticali coinvolte in un processo cognitivo o in una determinata patologia, permettendo una scomposizione funzionale del comportamento sia nel dominio spaziale che in quello temporale (Hernandez et al. 2014).

Bibliografia

Burt T, John CS, Ruckle JL, Vuong LT. Phase-0/microdosing studies using PET, AMS, and LC-MS/MS: a range of study methodologies and conduct considerations. Accelerating development of novel pharmaceuticals through safe testing in humans - a practical guide. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017 May;14(5):657-672.

Garner RC, Lappin G. The phase 0 microdosing concept. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2006;61(4):367-370. doi:10.1111/j.1365-2125.2006.02575.x.

Garner RC. Less is more: The human microdosing concept. 2005;10:449–51.

Hernandez-Pavon & Sarvas, Jukka & Ilmoniemi, Risto. (2014). TMS–EEG: From basic research to clinical applications. *AIP Conference Proceedings.* 1626. 10.1063/1.4901355.

Honey G. & Bullmore E. (2007). FMRI and pharmacology: what role in clinical practice?. *Clinical Applications of Functional Brain MRI.* 343.

Johnson, K. A., Fox, N. C., Sperling, R. A., & Klunk, W. E. (2012). Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine,* 2(4), a006213.

Kotrla JK & Weinberger DR. BRAIN IMAGING IN SCHIZOPHRENIA *Annual Review of Medicine* 1995 46:1, 113-122

- Nye J. & Howell L. (2016). Positron Emission Tomography (PET) Use in Pharmacology. 49-70. 10.1007/978-3-319-27883-4_3.
- Parvaz, M. A., Alia-Klein, N., Woicik, P. A., Volkow, N. D., & Goldstein, R. Z. (2011). Neuroimaging for drug addiction and related behaviors. *Reviews in the Neurosciences*, 22(6), 609-624.
- Purves, D. (2009). *Neuroscienze cognitive*. A. Zani (Ed.). Zanichelli.
- Seymour M. The best model for humans is human - how to accelerate early drug development safely. *Altern Lab Anim*. 2009 Sep;37 Suppl 1:61-5.
- Sheline, Y. I., Gado, M. H., & Kraemer, H. C. (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *American Journal of Psychiatry*, 160(8), 1516-1518.
- Shenton, M. E., Kubicki, M. Structural brain imaging in schizophrenia. In: SADOCK, B. J., SADOCK, V. A., RUIZ, P. (Eds.), *Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry*, Ninth Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia; 2009, pp.1497-1507.
- Stenström K, Sydoff M, Mattsson S. Microdosing for early biokinetic studies in humans. *Radiat Prot Dosimetry*. 2010 Apr-May;139(1-3):348-52. doi: 10.1093/rpd/ncq029. Epub 2010 Feb 18.
- Tartaglia, M. C., Rosen, H. J., & Miller, B. L. (2011). Neuroimaging in dementia. *Neurotherapeutics*, 8(1), 82-92.
- Venkatasubramanian G. Schizophrenia is a disorder of aberrant neurodevelopment: A synthesis of evidence from clinical and structural, functional and neurochemical brain imaging studies. *Indian J Psychiatry*. 2007 Oct-Dec; 49(4): 244-249.
- Wagner CC, Langer O. Approaches using molecular imaging technology -- use of PET in clinical microdose studies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Jun 19;63(7):539-46. doi: 10.1016/j.addr.2010.09.011. Epub 2010 Sep 29.
- Zoccatelli G., Alessandrini A., Serpelloni G., Rimondo C. Droghe e alterazioni del cervello. *Conoscere per Crescere. La rivista dei pediatri italiani per la famiglia*. Ottobre 2012
- Zoccatelli, G., Alessandrini, F., Serpelloni, G., Rimondo, C., Seri, C., & Federspiel, A. (2012). Permanenza di alterazioni cerebrali dopo assunzione di droghe anche dopo un periodo di cessazione dell'uso: il contributo del neuroimaging. *Italian Journal on Addiction*, 1(5-6).

2. Metodi *in silico* e modelli matematici

Nel termine “metodi *in silico*” sono racchiusi una serie di strumenti che consentono di stimare le proprietà chimico-fisiche, tossicologiche ed eco-tossicologiche di una sostanza chimica tramite simulazioni al computer. I progressi dell'informatica a partire dalla metà degli anni Novanta hanno rivoluzionato il nostro modo di vivere. È chiaro che gli sviluppi di questa disciplina hanno avuto un forte impatto anche nell'ambito della biologia e della medicina. La quantità di informazioni e di dati che può essere immagazzinata e analizzata è infinitamente superiore a ciò che ci si poteva aspettare anche solo pochi anni fa. L'accesso pubblico a questa massa di dati è ora molto più facile, soprattutto in conseguenza dell'avvento di internet e della creazione di banche dati on-line di ogni genere. Lo sviluppo di hardware e di software adeguati ha oggi reso possibile simulare, in maniera statica o dinamica, processi cellulari o fisiologici anche complessi. Si pensi, per esempio, ai modelli matematici che permettono di studiare la meccanica dei fluidi del sistema cardiovascolare e del microcircolo. Si pensi ancora all'implementazione di modelli al computer che permettono di predire la cinetica, la distribuzione tissutale, le proprietà biologiche e la tossicità di un farmaco sulla base di pochi punti sperimentali e/o della struttura chimica della molecola.

2.1. Qsar, fegato virtuale, cuore virtuale

Qsar

La relazione quantitativa struttura-attività, nota anche come QSAR dall'inglese "*Quantitative structure-activity relationship*", a cui talvolta ci si riferisce anche mediante il termine relazione quantitativa struttura-proprietà (QSPR), è una relazione matematica che esprime quantitativamente l'attività biologica di un farmaco in funzione di determinate caratteristiche chimico-fisiche o strutturali della molecola.

Questo approccio si fonda sul presupposto che il comportamento di una molecola quando si trova a dover oltrepassare una membrana cellulare o a instaurare un legame con uno specifico recettore, è influenzato dalle sue proprietà peculiari che a sua volta differenziano tale comportamento rispetto a quello che può assumere un altro tipo di molecola.

In tal modo, sulla base di modelli elaborati al computer grazie ad ausili bioinformatici sempre più potenti, è possibile concepire nuovi farmaci e prevederne le proprietà biologiche, la farmacocinetica, la biodisponibilità e la tossicità (Pharmainformatic, Thiel et al. 2017).

Un gruppo di ricercatori del CNRS, INSERM, Aix-Marseille University e AP-HM, sono riusciti per la prima volta nello sviluppo di un cervello virtuale personalizzato, progettando un modello base ed inserendo informazioni riguardanti un singolo paziente, come ad esempio il modo specifico in cui regioni del cervello sono organizzate e collegate nell'individuo. Modelli matematici che riproducano l'attività cerebrale possono essere testati in questo modo sul cervello virtuale. Gli scienziati inoltre sono stati in grado di riprodurre il luogo in cui le crisi epilettiche iniziano e come si propagano. Questo tipo di ricostruzione del cervello ha pertanto valore reale nel predire come si verifichino in ciascun paziente, ciò potrebbe portare ad una diagnosi molto più precisa della malattia (Jirsa et al. 2017).

Il progetto fegato virtuale

Il progetto "Virtual Liver Network" Rappresenta il più grande investimento del governo tedesco focalizzato sulla biologia e medicina dei sistemi. La biologia dei sistemi è una disciplina che studia gli organismi viventi in quanto sistemi che si evolvono nel tempo, ossia nell'interazione dinamica delle parti di cui sono composti.

La biologia dei sistemi, che tenta di fornire un'unica chiave di lettura del fenomeno vita, di fatto non è un concetto nuovo, poiché il tentativo di guardare a un sistema vivente in maniera globale per comprenderne appieno il funzionamento è insito nella ricerca scientifica degli ultimi decenni. Tuttavia, esso non era stato ancora sviluppato pienamente per la mancanza di strumenti computazionali e tecnologici adeguati che consentano di valutare simultaneamente più variabili dello stesso sistema.

Il progetto fegato virtuale rappresenta una delle più grandi sfide nel campo delle scienze della vita: integrare la grandissima mole di dati che abbiamo acquisito sul fegato umano a tutti i diversi livelli di investigazione durante l'era post-genomica, dagli studi bio-molecolari a quelli clinici. Questo modello dinamico sarà composto da quelle vie, reti, funzioni i cui dettagli sono necessari e sufficienti a generare una visione dinamica delle funzioni del fegato umano, validate nel contesto dell'anatomia e funzione d'organo, e capaci di generare previsioni sperimentalmente verificabili e rilevanti sulla fisiologia e la patologia del fegato.

Questo progetto sta contribuendo in modo significativo allo sviluppo di un nuovo paradigma in biologia e medicina (<http://www.virtual-liver.de/>).

È utile anche ricordare quanto la computeristica sia importante nel campo del *video-imaging* e della ricostruzione tridimensionale delle immagini che sono alla base di molte tecnologie usate in diagnostica umana e per gli studi clinici.

Il progetto cuore virtuale: iHEART

Alfio Quarteroni, matematico italiano che insegna all'Ecole Polytechnique Fédérale di Losanna, ha messo a punto iHEART, un modello matematico completo per studiare il comportamento del cuore umano e delle sue patologie che, grazie ad equazioni complesse, si può adattare ad ogni singolo paziente.

Lo scopo di iHEART è quello di realizzare un modello realistico completo del cuore umano, basandosi su equazioni fisiche e dati biologici di *imaging* come ecografia, risonanza magnetica e tomografia assiale, da un archivio di migliaia di pazienti.

Il cuore virtuale consentirà ai medici di capire meglio il funzionamento del cuore, di prevenire alcune patologie senza bisogno di indagini invasive, di migliorare l'intervento terapeutico e chirurgico quando necessari e di effettuare indagini e ottenere informazioni su campi che fino ad ora non erano indagabili dai medici. Si potrà studiare dettagliatamente il flusso del sangue all'interno dei ventricoli, capire quali sono e come si comportano le forze che agiscono sulle valvole cardiache, studiare il potenziale elettrico durante la fibrillazione e l'infarto

(https://cordis.europa.eu/project/rcn/210537_en.html).

Bibliografia

Pharmainformatic <http://www.pharmainformatic.com/>

Thiel C, et al. A Comparative Analysis of Drug-Induced Hepatotoxicity in Clinically Relevant Situations. PLoS Comput Biol. 2017 Feb 2;13(2):e1005280. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005280. eCollection 2017.

Jirsa VK, Proix T, Perdikis D, Woodman MM, Wang H, Gonzalez-Martinez J, Bernard C, Bénar C, Guye M, Chauvel P, Bartolomei F. The Virtual Epileptic Patient: Individualized whole-brain models of epilepsy spread. Neuroimage. 2017 Jan 15;145(Pt B):377-388.

3. Scienze -omiche: genomica, proteomica, metabolomica, esposomica

Prima di parlare delle scienze -omiche facciamo una brevissima e molto semplificata introduzione. L'informazione genetica delle nostre cellule è conservata nel DNA che può essere duplicato per la propagazione dell'informazione. Il DNA, per essere espresso nella cellula, viene trascritto sotto forma di RNA. L'RNA (se codificante) può essere tradotto in proteine, concepite come la forma "operativa" e terminale delle informazioni contenute nel DNA. Sono proteine gli ormoni, gli anticorpi, gli enzimi, i fattori di coagulazione ematici e quelli coinvolti nella contrazione muscolare.

Pertanto le proteine sono necessarie per tutte le attività biologiche. Il gene non è altro che una sequenza di DNA che codifica per una o più proteine.

Quando si parla di "scienze omiche" si intendono delle discipline che hanno per oggetto lo studio dell'insieme di geni (genomica), dei trascritti (trascrittomica), delle proteine (proteomica) e dei metaboliti (metabolomica), ecc. che vengono espressi da una cellula o da un organismo, diversamente da quanto fanno le scienze biologiche tradizionali che invece si occupano di studiare i processi biologici singolarmente. Si tratta, dunque, di guardare cellule e tessuti da una prospettiva diversa, prospettiva che probabilmente meglio si addice a descrivere dei sistemi come quelli biologici caratterizzati da un elevato grado di complessità. Chiaramente questo cambio epocale nella biologia è stato possibile grazie all'introduzione di nuove tecnologie come la Next Generation Sequencing (NGS), la spettrometria di massa e altre potenti tecniche biomolecolari.

Con il termine *Next Generation Sequencing* o sequenziamento in parallelo si indicano una serie di tecnologie che permettono di sequenziare grandi genomi in un tempo ristretto, dell'ordine di



settimane. Resta inteso, inoltre, che l'applicazione di queste tecniche produce molto spesso una mole enorme di informazioni che possono essere gestite solo tramite la bioinformatica.

Le scienze -omiche insieme alle nuove metodologie di ricerca costituiscono i componenti essenziali di una nuova ed emergente disciplina, indicata come *biologia dei sistemi*. Quest'ultima studia i sistemi che sono alla base del funzionamento dell'organismo vivente. Lo studio è condotto mediante analisi sistematiche e quantitative di tutti i componenti che concorrono alla definizione del sistema biologico. L'approccio di studio mediante la biologia dei sistemi mira alla descrizione estensiva di un sistema biologico, come l'organismo umano, attraverso l'integrazione di dati di tipo diverso. Lo scopo è quello di giungere a realizzare delle simulazioni computazionali che mimino il comportamento dei sistemi biologici più complessi.

3.1. Genomica

La genomica è la disciplina che si occupa della struttura, sequenza, funzione ed evoluzione del genoma, vale a dire di tutta l'informazione genetica contenuta nel DNA presente nelle cellule di una particolare specie. La grandezza del genoma e il numero dei geni ivi contenuti variano tra gli organismi viventi.

La genomica comprende principalmente due sotto-aree, una strutturale e una funzionale. La genomica strutturale si occupa della mappatura genetica, di quella fisica e del sequenziamento di interi genomi. La genomica funzionale mira a comprendere le modalità con cui i geni dirigono lo sviluppo e il funzionamento del nostro organismo e come il loro malfunzionamento induca uno stato patologico.

Genomica strutturale

Nel 1981 si ottenne la prima sequenza completa di un genoma, quello circolare di 16.569 coppie di basi (bp) del mitocondrio umano che, considerando la capacità di sequenziamento dell'epoca, rappresentò un risultato straordinario. Il genoma nucleare è 200.000 volte più grande e il suo sequenziamento sembrava un'impresa eccezionale. Tuttavia, i grandi avanzamenti realizzati nell'automazione del sequenziamento del DNA e nello sviluppo di programmi informatici per l'analisi di una vasta quantità di dati di sequenza hanno fatto sì che, a metà degli anni Ottanta, il sequenziamento di grandi genomi diventasse possibile.

Progetto genoma umano

La genomica moderna ha inizio con il sequenziamento del genoma umano. La possibilità di decodificare per intero il genoma umano fu discussa per la prima volta in un convegno scientifico organizzato nel 1985 da Robert L. Sinsheimer della University of California di Santa Cruz. L'importanza e la fattibilità di questo progetto furono ribadite nel 1986, in un convegno organizzato dal Ministero dell'energia degli Stati Uniti a Santa Fe, nel Nuovo Messico. Nello stesso anno, Renato Dulbecco, vincitore nel 1975 del premio Nobel per la fisiologia o medicina, espose in un editoriale pubblicato dalla rivista «Science» l'idea della mappatura del DNA umano per poter sconfiggere il cancro (Dulbecco 1986). Il progetto di sequenziare il genoma umano, denominato Progetto genoma umano (HGP, Human Genome Project) e approvato nel 1989 dal Congresso americano, ebbe inizio nel 1991 e prevedeva una durata di 15 anni. L'HGP fu condotto da un consorzio internazionale (IHGSC, International Human Genome Sequencing Consortium), a cui presero parte ricercatori appartenenti a 16 istituzioni tra Stati Uniti, Gran Bretagna, Francia, Germania e Cina.

Gli obiettivi iniziali dell'HGP furono i seguenti: determinare la sequenza dei 3 miliardi di bp che costituiscono il DNA umano; identificarne i geni; conservare le informazioni ottenute in banche dati pubbliche; sviluppare strumenti informatici per l'analisi dei dati; trasferire le tecnologie derivate al settore pubblico; affrontare gli aspetti di ordine etico, legale e sociale che sarebbero sorti con la realizzazione del progetto. Oltre al genoma umano, l'HGP ha finanziato il sequenziamento dei genomi di altri organismi, comunemente usati come modello negli studi genetici, al fine di rendere possibile lo studio comparativo dei genomi: il batterio *Escherichia coli*, il lievito *Saccharomyces*



cerevisiae, il moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*, il nematode *Caenorhabditis elegans*, il topo *Mus musculus*.

Genomica funzionale

Per conoscere un gene non è sufficiente identificarne la sequenza: bisogna anche determinarne l'esatta funzione e il modo in cui interagisce con altri geni, ovvero è necessario attribuirgli una connotazione funzionale. Questo particolare settore della ricerca è denominato genomica funzionale.

La genomica funzionale mira a comprendere le modalità con le quali i geni che compongono il nostro genoma dirigono lo sviluppo e il funzionamento del nostro organismo e come il loro malfunzionamento induca uno stato patologico.

Nata dal contributo di diverse discipline, si basa sulla bioinformatica per l'analisi computazionale della grande quantità di dati di laboratorio prodotta. Il principale scopo degli approcci computazionali è innanzitutto quello di fornire le corrette annotazioni funzionali di una data sequenza genica. Tali annotazioni prevedono l'identificazione di geni potenzialmente codificanti una o più proteine.

È noto come oltre il 99,5% del genoma di *Homo sapiens* sia identico in ogni individuo. Perciò, solo nella sua rimanente piccola porzione sono localizzate tutte le diversità genomiche, alcune delle quali possono influenzare il rischio individuale di sviluppare malattie, anche gravi.

La variabilità genetica della specie umana è quindi distribuita all'interno di circa 3 milioni di basi di DNA. Qui, sono presenti sia le varianti più frequenti del genoma, dette polimorfismi, che eventuali mutazioni, cioè varianti più rare, potenzialmente responsabili di malattie ereditarie.

L'approccio alla comprensione delle alterazioni genomiche che via via si identificavano nel DNA umano, inizialmente, riteneva non maligno tutto ciò che la selezione naturale avesse lasciato essere frequente nella popolazione generale.

Quindi, a fronte dell'iniziale benignità attribuita a tali varianti, essendo queste variazioni genetiche frequenti nelle popolazioni, successive evidenze scientifiche hanno anche dimostrato come, in specifici contesti molecolari e cellulari, anche queste varianti possano essere alla base di meccanismi patogenetici.

Infatti è stato recentemente dimostrato come la longevità nell'uomo sia riconducibile in parte alla variabilità stessa insita nel suo genoma. Inoltre, alcune varianti genetiche comuni sono state associate alle forme più aggressive di tumore al seno.

Nel corso degli anni, quindi, la scoperta dei polimorfismi nel genoma umano ha assunto un'importanza sempre maggiore, diventando un potentissimo strumento per specifiche analisi di biologia molecolare, volte alla comprensione delle basi genetiche delle patologie complesse.

Queste conoscenze sono utili per definire i possibili fattori genetici legati alla risposta individuale a stress ambientali, alla suscettibilità alle infezioni, alla risposta ad agenti farmacologici (farmacogenomica).

3.2. Proteomica

Il proteoma rappresenta l'insieme delle proteine di un organismo o di un sistema biologico, ossia l'insieme delle proteine prodotte dal genoma. La proteomica è la scienza che consente lo studio approfondito del proteoma, il completo corredo proteico espresso in una cellula o in un tessuto.

Sono proteine gli ormoni, gli anticorpi, gli enzimi, i fattori di coagulazione ematici e quelli coinvolti nella contrazione muscolare.

Pertanto le proteine sono necessarie per tutte le attività biologiche.

Il sequenziamento del patrimonio genetico di alcuni organismi, principalmente quello umano, assieme allo sviluppo e ai progressi nei metodi e nelle tecnologie di analisi, hanno aperto nuovi scenari conferendo alle proteine un ruolo sempre più importante suscitando un interesse sempre maggiore presso la comunità scientifica internazionale rendendo necessaria la nascita di un'ontologia che permettesse di riferirsi al nuovo campo di ricerca: la proteomica.



La proteomica mira a identificare le proteine e ad associarle con uno stato fisiologico in base all'alterazione del livello di espressione fra controllo e trattato. Permette di correlare il livello di proteine prodotte da una cellula o tessuto e l'inizio o la progressione di uno stato di stress.

La proteomica assieme alla genomica, ricoprono un ruolo fondamentale nella ricerca biomedica.

Lo studio del proteoma è infatti fondamentale per comprendere la fisiologia e i processi biologici umani.

Una delle scoperte più eclatanti della nuova era post-genomica, è che il vecchio paradigma secondo cui un gene codifica per una sola proteina risulta non essere più valido.

Infatti, a causa di modifiche post-traduzionali (glicosilazione, fosforilazione) delle proteine, ad un genoma possono corrispondere più di un proteoma, il cui limite superiore non è ancora definibile.

Il genoma di un essere vivente, anche quando completamente sequenziato, non permette di comprendere tutte le funzioni biologiche che caratterizzano un organismo.

Queste dipendono da molteplici fattori, tra i quali le vie regolatorie e metaboliche delle proteine.

La proteomica si rivela, pertanto, complementare alla genomica ed essenziale per la comprensione dei meccanismi biologici.

La proteomica consente lo studio delle proteine, sia nelle forme appena trascritte dai geni sia nelle isoforme. In biochimica, si definiscono "isoforme", delle versioni di una stessa proteina che presentano alcune piccole differenze rispetto alle altre, a causa di modifiche post-trascrizionali o post-traduzionali, che avvengono cioè in un secondo momento, ad esempio dopo la trascrizione o la traduzione.

Lo studio delle isoforme o di eventuali modifiche post-traduzionali consente la comprensione dei meccanismi di interazione tra le proteine, tali meccanismi condizionano l'attività e la funzione delle proteine.

La proteomica ha come obiettivo la definizione della funzione biologica di proteine il cui ruolo è ancora sconosciuto e l'identificazione dell'interazione proteina-proteina, per la descrizione a livello molecolare dei meccanismi cellulari.

Un altro obiettivo è lo studio qualitativo e quantitativo dei differenti profili di espressione delle proteine. L'espressione delle proteine può modificarsi per variazione delle condizioni cellulari (diverse condizioni di crescita, stress o presenza di patologie cellulari, ecc.). Il diverso profilo delle proteine rilevate in un tessuto, assenza, presenza o livelli quantitativi differenti, sono potenziali bioindicatori di uno stato fisiologico e/o patologico.

La proteomica è una scienza che mira ad indagare e a stabilire l'identità, la quantità, la struttura e le funzioni biochimiche e cellulari di tutte le proteine presenti in un tessuto, in una cellula o in un comparto sub-cellulare, descrivendo come queste proprietà siano variabili nello spazio, nel tempo o in un determinato stato fisiologico.

Alcuni obiettivi della proteomica:

- Comparazione fra tessuti malati e normali;
- Comparazione fra tessuti malati e trattati farmacologicamente;
- Identificazione di nuovi bersagli proteici per farmaci;
- Studio delle modificazioni post-traduzionali;
- Strategie integrate con la genomica;
- Analisi dei tessuti nelle patologie tumorali.

3.3. Metabolomica

Il metaboloma rappresenta l'insieme di tutti i metaboliti di un organismo biologico, che sono i prodotti finali della sua espressione genica. La metabolomica (o metabonomica) è la scienza che studia il metaboloma. E così, mentre i dati dell'espressione genica e delle analisi proteomiche da soli non



spiegano esaurientemente ciò che potrebbe succedere in una cellula, un tessuto, o un organo, il profilo metabolico può fornire un'istantanea della fisiologia di quel sistema.

La metabolomica è particolarmente interessante in farmacologia nell'ottica della medicina personalizzata (farmacometabolomica) in quanto rende possibile correlare le variazioni del profilo metabolico con la risposta al trattamento a specifici farmaci e a predire la tossicità o l'efficacia di farmaci e sostanze in base all'assetto metabolomico (Li et al. 2017, Everett 2015, 2016).

3.4. Esposomica

Il concetto di esposoma fu proposto per la prima volta da Christopher Wild, direttore dello IARC di Lione, in un articolo apparso su CEBP nel 2005 ("Complementing the Genome with an Exposome: the Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology"). Esposoma è l'insieme delle esposizioni di un soggetto per una vita intera, dal concepimento alla morte. In esso quindi è compresa tutta la storia delle interazioni personali con l'ambiente: non solo quindi gli agenti chimici e fisici presenti nell'aria e nell'acqua, ma anche tutto quanto nello stile di vita (alimentazione, alcol, esercizio fisico, fumo, stress ecc.) lasci la propria firma molecolare nell'organismo.

L'esposomica è la scienza che studia l'esposoma. Si preoccupa quindi di capire come le interazioni tra le esposizioni ambientali (dieta, stile di vita, ecc.) e le nostre caratteristiche uniche quali la genetica, la fisiologia, ecc. impattano la nostra salute.

Fino ad oggi l'epidemiologia ambientale si è basata su misurazioni indirette, spesso semplicemente la distanza dei soggetti dalle fonti inquinanti (le cui emissioni vengono ricostruite con modelli di dispersione).

È però di fatto impossibile catturare, ad esempio, la reale associazione fra la presenza di un determinato inquinante ambientale e una determinata malattia basandosi solo sulle misure di esposizione e i questionari tradizionalmente usati.

Un biomarcatore è rappresentato da una modificazione (di tipo molecolare, biochimico, genetico, immunologico o fisiologico) che consente di rilevare un evento in un sistema biologico che possa influenzare o predire l'insorgenza o l'evoluzione di una malattia.

L'approccio esposomico potrebbe far emergere associazioni anche inaspettate fra biomarcatori e le principali malattie croniche, di cui si sospetta ormai da tempo una robusta radice nelle esposizioni ambientali. Non solo sostanze chimiche, quindi, ma anche – ad esempio – la pressione esercitata dallo stress psicosociale, che può tradursi a livello organico nell'accorciamento dei telomeri e in altre risposte biologiche, conseguenti ad attivazioni neuroendocrine, o particolari espressioni geniche. Una nuova frontiera scientifica capace finalmente di ricondurre anche realtà più sfuggenti come la salute mentale e la sindrome di status alla genesi delle malattie organiche (Lioy and Rappaport 2011).

Da questi approcci cominciano già ad arrivare i primi risultati importanti, come la "firma trascrittomico" del benzene, il diverso profilo dei micro-RNA in fumatori e non-fumatori, o degli studi di associazione fra esposoma e metaboloma nel Parkinson (vedi *The Exposome: A powerful Approach for Evaluating Environmental Exposures and Their Influences on Human Diseases*, The National Academies, USA).

In questa nuova teoria unificata della patogenesi - simile, per ambizione alla teoria della grande unificazione in fisica - la medicina recupera una visione olistica (ma scientifica) della salute, e non potrà che essere sviluppata attraverso grandi progetti internazionali come *Exposomics* (Callaway e Daily 2012).

Implicazioni delle scienze -omiche

Per molti anni la diagnosi e il trattamento si sono focalizzati sulla generalizzazione di dati statistici ottenuti su grandi casistiche di pazienti, senza tenere in considerazione le differenze interindividuali.

Per esempio, molti tipi di cancro sono caratterizzati principalmente mediante l'analisi istopatologica o le tecniche di *imaging*; è di comune riscontro clinico, però, l'osservazione di differenti mutazioni genetiche o profili proteomici o di espressione genica neoplastici in pazienti con lo stesso tipo di tumore; questa eterogeneità genetica e fenotipica potrebbe determinare differenti risposte alle terapie farmacologiche nonché alla prognosi (decorso clinico e *outcome*, ovvero risultato). Pertanto, risulta sempre più rilevante l'identificazione del sottotipo di tumore, cosa che oggi è resa possibile grazie ai nuovi approcci metodologici basati sulle scienze -omiche.

Le "scienze omiche", infatti, consentono la caratterizzazione sempre più dettagliata dei processi biologici (genetici, cellulari e biochimici) correlati con le caratteristiche cliniche dei tumori portando così all'identificazione delle differenze interindividuali. Dunque, le informazioni derivanti da queste analisi consentiranno delle diagnosi sempre più dettagliate e precise. Inoltre, questo tipo di approccio consentirà lo sviluppo di terapie personalizzate, cioè più efficaci e sicure. In particolare, i profili molecolari potrebbero fornire informazioni aggiuntive per la sottotipizzazione tumorale e per l'identificazione precoce di aberrazioni molecolari ignote d'importanza clinica.

Il tumore, ma anche altre patologie, dovrebbero essere intese come entità in evoluzione e, dunque, suscettibili a variazione dei profili -omici nel corso del tempo; questo potrebbe manifestarsi, ad esempio, con l'acquisizione della resistenza al trattamento farmacologico o ad un differente outcome. Una delle sfide della biologia dei sistemi è di integrare le varie scienze -omiche per avere una visione d'insieme più completa degli organismi viventi.

Abbiamo oggi in mano degli strumenti potentissimi, le cui potenzialità erano inimmaginabili fino a poche decine di anni fa. Tutto ciò rappresenta, però, un punto di partenza e non di arrivo nella comprensione della biologia umana.

Bibliografia

[1000 Genomes Project Consortium. et al.](#), "A global reference for human genetic variation.", *Nature*, 2015 Oct 1;526(7571):68-74

Callaway E. Daily dose of toxics to be tracked. *Nature*. 2012 Nov 29;491(7426):647. doi: 10.1038/491647a.

Everett JR. From Metabonomics to Pharmacometabonomics: The Role of Metabolic Profiling in Personalized Medicine. *Front Pharmacol*. 2016 Sep 8;7:297. doi: 10.3389/fphar.2016.00297. eCollection 2016.

Everett JR. Pharmacometabonomics in humans: a new tool for personalized medicine. *Pharmacogenomics*. 2015;16(7):737-54. doi: 10.2217/pgs.15.20. Epub 2015 May 1.

Li B., He X, Jia W., Li H. *Molecules*. 2017 Jul 13;22(7). pii: E1173. doi: 10.3390/molecules22071173. Novel Applications of Metabolomics in Personalized Medicine: A Mini-Review.

Lioy PJ, Rappaport SM. 2011. Exposure science and the exposome: an opportunity for coherence in the environmental health sciences. *Environ Health Perspect* 119A466–A467.; 10.1289/ehp.1104387

Sitografia

The 1000 genome project <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/28889>

The Exposome: A powerful Approach for Evaluating Environmental Exposures and Their Influences on Human Diseases <https://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2010/theexposome.php>

4. Modelli *in chemico*

La maggior parte degli effetti biologici è causata dall'interazione chimica di una molecola, come ad esempio un farmaco, e una macromolecola biologica. Per esempio, una molecola che reagisce con il DNA può portare a mutagenesi, se reagisce con una proteina del sistema immunitario può portare a sensibilizzazione, mentre se interagisce con una cellula della pelle può portare a irritazione.

Tali interazioni possono essere interpretate in termini di meccanismi chimici (organici) e sfruttate per la previsione degli effetti biologici. Se siamo in grado di comprendere queste interazioni e acquisire le informazioni pertinenti, potremmo essere in grado di utilizzare le conoscenze per prevedere la tossicità di una sostanza senza ricorrere alla sperimentazione sugli animali.

Questa area di acquisizione delle conoscenze relative alla reattività intrinseca di una sostanza è denominata "*in chemico*", in linea con *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. È importante sottolineare che le tecniche *in chemico* non dovrebbero essere viste come un altro approccio *in vitro*: sono misure fisico-chimiche e non contengono infatti materiale biologico (ad eccezione di alcuni approcci che utilizzano frazioni enzimatiche).

Ci sono due direzioni principali di questa ricerca:

- Valutazione della reattività nello sviluppo dei farmaci, con particolare enfasi sull'identificazione di composti che possono essere associati alla tossicità idiosincratca del farmaco e alla formazione di intermedi reattivi (Caldwell e Yan 2006). La ricerca in questo campo è stata stimolata dalla necessità di eliminare la tossicità e gli effetti collaterali dei farmaci già nella fase iniziale di sviluppo. Ci sono relativamente poche pubblicazioni a sostegno di questo settore.

- Valutazione della reattività per identificare la potenziale tossicità (principalmente di composti non farmacologici), in particolare la sensibilizzazione cutanea e, più recentemente, l'esame della sensibilizzazione respiratoria e di altre tossicità umane non acute, nonché tossicità acuta su pesce (test ecotossicologici) (Roberts et al. 2008). La ricerca in questo campo è stata stimolata dalla necessità di trovare strategie alternative ai test di tossicità tradizionali per fornire soluzioni nello sviluppo e nella registrazione dei prodotti, oltre che essere spinta dalla direttiva sui cosmetici (divieto di testare i prodotti sugli animali dal 2013) e dalle necessità imposte dal regolamento REACH. Questa area è ben supportata da pubblicazioni, in particolare negli ultimi anni.

La considerazione di queste due aree mostra anche che ci sono stati pochi tentativi di integrare i risultati derivanti dal processo di sviluppo dei farmaci con quei risultati che sono emersi dalla necessità di soddisfare la legislazione sulle sostanze chimiche (Cronin et al. 2009).

I metodi *in chemico* sono stati utilizzati in diversi casi per risolvere problemi nell'identificazione della tossicità, con diversi *endpoint* che vanno dalla sensibilizzazione cutanea (Mahesh et al. 2018, Roberts et al. 2008, Roberts e Williams 1982, Gerberick et al. 2004, Gerberick et al. 2007, Schultz et al. 2009, Aleksic et al. 2007, Aleksic et al. 2009, Roberts e Natsch 2009, Achilleos 2009, Natsch et al. 2007, Natsch e Gfeller 2008, Natsch et al. 2009, Gerberick et al. 2008), alla tossicità epatica (Chan et al. 2008), ematopoietica (Gan et al. 2009), alla mutagenicità (Harder et al. 2003).

Un esempio di test *in chemico* per la sensibilizzazione cutanea: il DPRA (e la sua evoluzione)

La dermatite allergica da contatto è un comune rischio professionale ed ambientale per la salute. Si tratta di una reazione di ipersensibilità di tipo ritardato mediata da particolari cellule del sistema immunitario (linfociti T) e da piccole molecole esogene dette apteni. Nella fase di sensibilizzazione, i complessi formati da un aptene con un vettore endogeno sono presentati a particolari cellule del sistema immunitario della pelle per causare l'attivazione dei linfociti T. Dopo una ri-esposizione all'aptene nell'individuo sensibilizzato, i linfociti T innescano il processo infiammatorio che porta a sintomi clinici come il prurito e l'eritema. Gli apteni di per sé non sono in grado di scatenare una risposta immunitaria, si tratta di sostanze chimiche a basso peso molecolare che si legano a molecole

endogene che fungono da *carrier*, principalmente peptidi e proteine epidermiche ma anche a piccole molecole endogene, presenti in tutti i tessuti.

Uno dei metodi tradizionali più comuni per determinare il potenziale di sensibilizzazione della pelle è il test del linfonodo (LLNA). LLNA comporta la misurazione della proliferazione delle cellule T nei linfonodi drenanti dopo l'applicazione topica ripetuta di prodotti chimici di prova sulla pelle dell'orecchio dei topi. Nel saggio, l'aumentata proliferazione cellulare in seguito al contatto con una sostanza chimica potenzialmente sensibilizzante viene confrontata con un controllo e la sostanza chimica è classificata come sensibilizzante o non sensibilizzante. Tuttavia, con il divieto dei test sugli animali per i cosmetici e i loro ingredienti e con l'attuazione del regolamento europeo sulla Registrazione, la valutazione, Autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche (REACH), lo studio dei metodi che non utilizzano animali ha subito un rapido incremento portando allo sviluppo e al perfezionamento di nuove metodologie, come ad esempio il DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay).

Il DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) è un metodo *in chemico* utilizzato per predire il legame delle proteine epidermiche. Il legame delle proteine epidermiche è l'evento molecolare che innesca la reazione di sensibilizzazione (Adverse Outcome Pathway). Il DPRA utilizza la cromatografia HPLC per misurare l'esaurimento dei peptidi sintetici in soluzione dopo l'esposizione ai prodotti chimici da testare.

Il test DPRA, qualora utilizzato come parte di un approccio integrato insieme a test su cellule umane coltivate in 3D (ad esempio Keratinosens ©, linee guida OECD, 2014) può essere efficacemente impiegato per la classificazione dei sensibilizzanti e non sensibilizzanti, e per l'etichettatura dei prodotti.

Il DPRA presenta alcune limitazioni, tra cui i costi elevati di sintesi dei peptidi che devono essere altamente puri, la difficoltà a controllare le reazioni ed i processi di estrazione dopo l'incubazione dei peptidi con la sostanza chimica da testare.

Per ovviare a questi problemi, recentemente è stato sviluppato un metodo molto simile ma che invece di considerare il legame a macromolecole quali i peptidi, utilizza il legame a piccole molecole (glutazione e cisteamina) presenti abbondantemente in tutti i tessuti, compresa la pelle (Mahesh et al. 2018). Questo metodo, che rappresenta un'ulteriore evoluzione del DPRA, permette di ottenere gli stessi risultati a costi inferiori ed in modo più preciso.

Bibliografia

Achilleos, C., Tailhardat, M., Courtellemont, P., Le Varlet, B. & Dupont, D. (2009). Investigation of surface plasmon resonance biosensor for skin sensitizers studies. *Toxicology in Vitro* 23, 308–318.

Aleksic, M., Pease, C.K., Basketter, D.A., Panico, M., Morris, H.R. & Dell, A. (2007). Investigating protein haptentation mechanisms of skin sensitizers using human serum albumin as a model protein. *Toxicology in Vitro* 21, 723–733.

Aleksic, M., Thain, E., Roger, D., Saib, O., Davies, M., Li, J., Aptula, A. & Zazzeroni, R. (2009). Reactivity profiling: covalent modification of single nucleophile peptides for skin sensitization risk assessment. *Toxicological Sciences* 108, 401–411.

Caldwell, G.W. & Yan, Z. (2006). Screening for reactive intermediates and toxicity assessment in drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 9, 47–60.

Cronin TD, Mark & Bajot, Fania & J Enoch, Steven & Madden, Judith & Roberts, David & Schwöbel, Johannes. (2009). The In Chemico-In Silico Interface: Challenges for Integrating Experimental and Computational Chemistry to Identify Toxicity. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*. 37. 513-21.

- Gan, J., Ruan, Q., He, B., Zhu, M., Shyu, W.C. & Humphreys, W.G. (2009). In vitro screening of 50 highly prescribed drugs for thiol adduct formation. Comparison of potential for drug-induced toxicity and extent of adduct formation. *Chemical Research in Toxicology* 22, 690–698.
- Gerberick, F., Aleksic, M., Basketter, D., Casati, S., Karlberg, A.T., Kern, P., Kimber, I., Lepoittevin, J.P., Natsch, A., Ovigne, J.M., Rovida, C., Sakaguchi, H. & Schultz, T. (2008). Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. *ATLA* 36, 215–242.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W. & Lepoittevin, J-P. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81, 332–343.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Foertsch, L.M., Price, B.B., Chaney, J.G. & Lepoittevin, J-P. (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97, 417–427.
- Mahesh Raj Nepal, Rajina Shakya, Mi Jeong Kang, Tae Cheon Jeong, A simple in chemico method for testing skin sensitizing potential of chemicals using small endogenous molecules, *Toxicology Letters*, Volume 289, 2018, Pages 75-85, ISSN 0378-4274,
- Natsch, A. & Gfeller, H. (2008). LC-MS-based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the in vitro prediction of the skin sensitization potential. *Toxicological Sciences* 106, 464–478.
- Natsch, A., Emter, R. & Ellis, G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicological Sciences* 107, 106–121.
- Natsch, A., Gfeller, H., Rothaupt, M. & Ellis, G. (2007). Utility and limitations of a peptide reactivity assay to predict fragrance allergens in vitro. *Toxicology in Vitro* 21, 1220–1226.
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Test Guideline: *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, May 2014
- Roberts, D.W. & Natsch, A. (2009). High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: application to skin sensitization potency of Michael acceptor electrophiles. *Chemical Research in Toxicology* 22, 592–603.
- Roberts, D.W. & Williams, D.L. (1982). The derivation of quantitative correlation between skin sensitization and physicochemical parameters for alkylating agents, and their application to experimental data for sultones. *Journal of Theoretical Biology* 99, 807–825.
- Roberts, D.W., Aptula, A.O., Patlewicz, G. & Pease, 520 M.T.D. Cronin et al. C. (2008). Chemical reactivity indices and mechanism-based read-across for non-animal based assessment of skin sensitisation potential. *Journal of Applied Toxicology* 28, 443–454
- Schultz, T.W., Rogers, K. & Aptula, A.O. (2009). Read-across to rank skin sensitization potential: subcategories for the Michael acceptor domain. *Contact Dermatitis* 60, 21–31.

5. Metodi chimici, biomolecolari ed altri

Si tratta di tecnologie di laboratorio avanzate a supporto della ricerca biomedica *human based*. Non dobbiamo infatti scordare che gran parte delle cose oggi possibili nel mondo della ricerca biomedica le dobbiamo, oltre alle tecnologie informatiche, anche ai progressi nei campi della fisica, dell'ingegneria e delle biotecnologie. Esempi di strumenti innovativi biotecnologici che svolgono un ruolo di primo piano nello sviluppo di una scienza basata sulla biologia umana sono:

- Spettrometria di massa e spettrometria di massa ultrasensibile;
- Tecnologia *microarray* (DNA-chip)
- Tecniche avanzate di modifica del genoma: CRISPR/Cas9;
- Alternative agli anticorpi monoclonali: affimeri;
- Alternative al siero fetale bovino (FBS) per le colture cellulari;
- Bio-stampanti 3D

5.1. Spettrometria di massa e spettrometria di massa ultrasensibile

La spettrometria di massa è una tecnica analitica potente usata per identificare prodotti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole. Tutto questo può essere effettuato con quantità di campione estremamente limitate (in alcuni casi meno di un picogrammo ossia un milionesimo di milionesimo di grammo!) a concentrazioni molto basse in miscele complesse (fino a una parte per mille miliardi).

Viene comunemente usata in combinazione con altre tecniche separative quali la cromatografia.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica.

Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica e alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto.

La spettrometria di massa fornisce informazioni attendibili per una grande varietà di persone che operano in campi diversi: medici, magistrati, ingegneri addetti al controllo di processo, chimici, astronomi e biologi, tanto per citare alcune categorie. Ha moltissime applicazioni in altrettanti campi, tra cui citiamo solo alcune:

- Rivelare e identificare l'uso di steroidi da parte di atleti.
- Controllare in tempo reale la respirazione di pazienti da parte degli anestesisti durante interventi chirurgici.
- Determinare la composizione di specie molecolari rilevate nello spazio.
- Determinare se il miele è stato adulterato con l'uso di sciroppi zuccherini.
- Localizzare depositi di petrolio misurando precursori nelle rocce.
- Controllare in continuo le fermentazioni per l'industria biotecnologica.
- Determinare la presenza di diossine in pesce contaminato.
- Determinare il danno genetico dovuto a cause ambientali.
- Identificare la struttura di biomolecole, come carboidrati, acidi nucleici e steroidi.
- Determinare "come" i farmaci vengono utilizzati dall'organismo.
- Effettuare analisi in medicina legale, come la conferma e la misura quantitativa di droghe e del loro abuso.
- Effettuare analisi di sostanze inquinanti per l'ambiente.
- Stabilire l'età e l'origine di campioni geochimici e archeologici.
- Identificare e determinare quantitativamente i componenti di miscele organiche complesse.
- Effettuare analisi inorganiche multielementari con elevatissima sensibilità.

La spettrometria di massa trae le sue origini, nella prima parte di questo secolo, dalle esperienze di J.J.Thompson, il quale mise in evidenza la formazione di elettroni e "radiazioni positive" in un tubo posto sotto vuoto, nel quale veniva applicata una differenza di potenziale elettrico. Thompson, un

fisico, osservò che tale nuova tecnica poteva essere utile al chimico per analizzare sostanze, come descritto nel suo libro “Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis”. Nonostante questa lungimirante osservazione, l’applicazione primaria della spettrometria di massa rimase confinata nel campo della fisica per circa trent’anni. Essa è stata usata in particolare per individuare uno svariato numero di isotopi, per determinare la loro abbondanza relativa e per misurare la loro massa esatta, ossia la massa atomica con una precisione di 1 parte per milione o anche superiore. Queste fondamentali e importanti misure hanno permesso di creare le basi per sviluppi successivi in diversi campi che vanno dalla geocronologia alla ricerca biomedica.

Applicazioni della cromatografia e spettrometria di massa alla ricerca biomedica del 21esimo secolo:

- Rivelazione di biotossine algali

Le biotossine algali sono sostanze tossiche prodotte da alcuni tipi di alghe unicellulari microscopiche che vivono in sospensione nelle acque (fitoplancton). Alcune di queste alghe, principalmente appartenenti alle classi dei Dinoflagellati e delle Diatomee, hanno la capacità di produrre tossine. I molluschi bivalvi (mitili, ostriche ecc.), in quanto organismi filtratori, ingerendo le microalghe accumulano la tossina nel loro organismo e qualora vengano ingeriti dall’uomo possono provocare gravi intossicazioni.

Tra i metodi strumentali utilizzati per la rivelazione delle biotossine, un posto di rilievo è occupato dalle tecniche di accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (LC-MS). L’LC-MS si è dimostrato uno strumento estremamente utile per la determinazione qualitativa e quantitativa delle tossine nel plancton e nei mitili, per l’identificazione di nuove tossine e la ricerca sul metabolismo delle tossine nei molluschi eduli (Quilliam 1996 e 1997).

Metodi analitici basati sulla combinazione HPLC-MS sono stati sviluppati per le principali classi di biotossine marine: acido domoico e altre tossine simili, acido okadaico e altre tossine simili, saxitossina e altre tossine simili, brevitossina, spirolidi e ciguatossina. È, infatti, questa la sola tecnica che si è dimostrata valida per l’analisi di tutte le tossine e che soddisfa le esigenze sia dei laboratori interessati al monitoraggio che alla ricerca sulle biotossine marine. L’accoppiamento HPLC-Massa fornisce infatti:

- Possibilità di rivelazione universale
- Alta sensibilità, con limiti di rivelazione nell’ordine delle parti per bilione
- Alta selettività e specificità
- Minimo *clean-up* del campione
- Possibilità di esaminare tossine labili e molto diverse strutturalmente
- Quantificazione accurata e precisa
- Ampio *range* di risposta lineare
- Possibilità di automazione
- Alta produttività
- Rapidità nella messa a punto di metodi analitici
- Accettabilità legale negli studi confirmatori

Informazioni strutturali per l’identificazione di nuove tossine, analoghi di tossine note e metaboliti. L’alto costo iniziale dei sistemi e la necessità di personale specializzato rappresentano le principali difficoltà per molti laboratori, per quanto recentemente siano stati introdotti strumenti relativamente poco costosi, facili da usare, versatili e di dimensioni ridotte e che così in parte hanno risolto tali problemi.

Spettrometria di massa ultrasensibile e *microdosing*

La spettrometria di massa con acceleratore (AMS) è una tecnica di rivelazione ultrasensibile che può essere usata per quantificare il carbonio 14. Con la somministrazione di piccole quantità di sostanze marcate con il carbonio-14 l’AMS può essere utilizzato per ottenere in modo non invasivo dati clinici

(da esseri umani) nelle fasi iniziali del processo di sviluppo dei farmaci (ad esempio vedi *microdosing*, di cui abbiamo parlato precedentemente). Tali studi: a) possono essere utili per capire la farmacocinetica umana utilizzando la tecnica del *microdosing*; b) sono in grado di fornire informazioni sul metabolismo umano, e c) sono in grado di fornire dati di farmacocinetica fondamentali, tra i quali la biodisponibilità assoluta, favorendo uno scientificamente ottimale e conveniente design di studio. Avere a disposizione questi dati clinici il prima possibile potrà portare a migliorare il processo decisionale e quindi a ridurre i tempi e i costi coinvolti nel processo di sviluppo dei farmaci, nonché il ricorso ai modelli animali, notoriamente di scarsa rilevanza clinica per gli studi farmacocinetici e di biodisponibilità (Seymour 2009).

5.2. Tecnologia micro-array (DNA-chip)

L'espressione genica è il processo attraverso il quale l'informazione contenuta in un gene è usata per la sintesi di un prodotto genico funzionale. Questi prodotti genici sono spesso proteine (che, a loro volta, risultano dalla traduzione di un RNA messaggero trascritto dal gene in oggetto), ma esistono geni che non codificano per proteine ed il prodotto è un RNA funzionale o altri piccoli RNA la cui funzione risulta essere sempre più importante nella regolazione genica.

Salvo pochissime eccezioni, le cellule dell'organismo contengono tutte un corredo cromosomico completo e gli stessi geni. Nelle diverse cellule, però, è espressa solo una sottopopolazione di tutti i possibili geni e questo conferisce a ciascun tipo cellulare le sue caratteristiche di unicità. L'espressione genica è un processo sottoposto a una regolazione molto sofisticata, per garantire una risposta dinamica al variare degli stimoli extra e intracellulari. Questo meccanismo di regolazione è dotato di interruttori ON/OFF che consentono l'accensione o lo spegnimento di specifici geni, ma anche il controllo del loro "volume", cioè del livello della loro espressione. Per capire come una cellula risponde alle continue modifiche dell'ambiente è dunque molto importante studiare quali e quanti mRNA vengono prodotti e cioè quali geni sono espressi (e quanto).

I Microarray a DNA: una tecnologia per studiare l'espressione dei geni

Il Progetto Genoma Umano ha fatto crescere esponenzialmente la quantità di informazioni disponibili sulla sequenza nucleotidica del genoma umano. Sono stati così identificati moltissimi nuovi geni, catalogati e organizzati in banche dati biomediche accessibili e utilizzabili da tutti i centri di ricerca.

L'impatto del completamento del Progetto Genoma Umano sarà interamente compreso quando si riuscirà a identificare tutte le funzioni dei nuovi geni. La tecnologia dei Microarrays facilita l'identificazione, la classificazione e l'attribuzione della funzione dei vari geni. Utilizzando particolari supporti solidi (nel caso più semplice un vetrino) sui quali sono legate, secondo uno schema predefinito (*array*), sequenze di DNA derivate da moltissimi geni diversi di un dato organismo (potenzialmente tutti), è possibile determinare, con un singolo esperimento, la loro espressione in modo estremamente rapido ed efficace.

Un microarray a DNA (chiamato anche biochip o DNA-chip) è costituito da una serie di pozzetti microscopici su una superficie solida. Ogni pozzetto contiene delle sonde (ad es. frammenti di DNA a singolo filamento).

I microarrays possono essere utilizzati per misurare i livelli di espressione di un elevato numero di geni contemporaneamente. Ogni spot contiene quantità piccolissime, picomolari, di una specifica sequenza di DNA (chiamata sonda). In termini semplici, la sonda si ibridizza, cioè si associa, con il/i campione/i (target) costituito/i dal DNA da studiare. I campioni vengono generalmente marcati con fluorofori per permetterne il rilevamento e la quantificazione relativa.

Il Microarray si basa sull'ibridazione molecolare fra sequenze nucleotidiche complementari. Quando due sequenze complementari si "riconoscono", si formano legami chimici fra basi

complementari. Un computer è in grado di misurare con precisione la quantità di sonda legata in ciascuna posizione del vetrino e generare un profilo di espressione genica per ogni tipo cellulare. Attualmente esistono dei software in grado di aiutare l'operatore nella difficile interpretazione dei dati. Tali programmi permettono di estrapolare dai dati di espressione genica informazioni relative alle funzioni biologiche, biochimiche e alla localizzazione cellulare delle proteine codificate dai geni differenzialmente espressi, nonché delle pathways metaboliche in cui sono coinvolte.

I microarrays a DNA possono trovare applicazioni vastissime. Con questo potentissimo strumento di indagine, i ricercatori sono in grado, per esempio, di:

- Comprendere alcuni aspetti fondamentali dei processi della crescita e dello sviluppo;
- Esplorare le cause genetiche di molte malattie;
- Identificare geni correlati a particolari malattie (tumori, malattie neurologiche, infiammatorie, ecc.);
- Identificare nuovi potenziali bersagli per la terapia;
- Identificare variazioni nell'espressione genica in seguito a trattamenti con determinati farmaci, esposizione a sostanze tossiche o xenobiotici (tossicogenomica e farmacogenomica);

I dati ottenuti da microarray vengono verificati anche attraverso RT-PCR quantitativa (Crepaldi et al. 2010).

Microarrays proteici

Un microarray proteico è costituito da un supporto solido (slide) sul quale diversi reagenti (proteine purificate, peptidi, anticorpi, allergeni, ecc.) sono depositati in maniera ordinata e ad una specifica e definita densità. Ognuno di questi agenti cattura la propria proteina target, isolandola così da una miscela complessa, quale può essere, per esempio, un lisato cellulare, e le proteine catturate vengono successivamente evidenziate e quantificate o valutate per quanto concerne la loro attività, le modificazioni, le interazioni proteina-proteina. Mentre il DNA microarray permette di studiare l'espressione genica, il protein microarray fornisce informazioni sul proteoma.

I microarrays assumono notevole importanza soprattutto in un'ottica integrata: in virtù delle loro vaste applicazioni, qualora utilizzate opportunamente, contribuiscono ad una ricerca maggiormente focalizzata sull'uomo (Capaldi 2010).

Editing genomico

Il Genome Editing (GE) è una tecnica di biologia molecolare che permette di modificare in modo permanente il DNA di una cellula creando sostituzioni, inserzioni o delezioni. Esso richiede il taglio della doppia elica del DNA in punti specifici del genoma a opera di proteine chiamate nucleasi (una sorta di "forbici molecolari"). Il taglio è seguito da un processo naturale di riparazione del DNA che può portare o alla inattivazione del gene bersaglio, oppure alla correzione di mutazioni specifiche, a seconda della metodica utilizzata.

A causa della sua complessità sperimentale, il GE è stato poco utilizzato in campo biomedico fino alla scoperta del sistema CRISPR/Cas9, avvenuta di recente. Tramite questo sistema, alla portata anche di laboratori piccoli e relativamente poco attrezzati, è oggi possibile effettuare studi della funzione genica umana su modelli cellulari umani.

Metodi per modificare il genoma di cellule e organismi sono stati utilizzati già da molti anni dai ricercatori, soprattutto per effettuare approcci di *reverse genetics*. Quest'ultima è una strategia che consiste nello studiare le funzioni di un gene analizzando gli effetti che una sua alterazione, o addirittura inattivazione, provoca in cellule o in interi organismi. Si contrappone alla strategia opposta (*forward genetics*), in cui si parte dalla valutazione di un fenotipo alterato (tipicamente un quadro



patologico) e si cerca di risalire alle sue basi genetiche identificandone il gene responsabile. Le procedure che venivano utilizzate per effettuare GE negli ultimi due decenni del secolo scorso erano però applicabili o a modelli cellulari molto semplici (es. lieviti) o modelli animali, con limitata rilevanza per lo studio di malattie umane e/o tempi di attuazione molto lunghi

https://sip.it/wpcontent/uploads/2016/10/03_Frontiere.pdf)

5.3. Editing genomico di ultima generazione: CRISPR/Cas9

È una tecnica di modifica del genoma precisa e potente, di correzione di uno o più geni in qualsiasi cellula.

La tecnica usa la collaborazione della Cas 9 e di una piccola molecola guida costituita da materiale genetico. La macchina molecolare così costruita si ispira a un sistema batterico chiamato Crispr presente in circa la metà dei batteri e nel 90% degli archea.

Crispr è l'acronimo di *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, una frase traducibile come “brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari”.

Cas9 è invece il nome della proteina associata a Crispr: insieme ad altre proteine simili fa parte di un sistema chiamato Crispr associated system.

In natura Crispr e Cas9 formano un complesso che funge da “sistema immunitario” per i batteri: tra una sequenza ripetuta e l'altra ci sono tratti di Dna che "archiviano" quelli di virus che hanno attaccato i batteri. Prendendo questi tratti come stampo, le proteine Cas attaccano i virus che contengono quel tratto di Dna e lo degradano.

La scoperta del meccanismo immunitario dei batteri si deve a decenni di ricerche di biologia di base, come quelle che hanno appunto portato alla scoperta del "sistema immunitario" dei batteri. Quelle ricerche sono poi state perfezionate e ulteriormente sviluppate in alcuni laboratori statunitensi ed europei. Le prime ricercatrici a capire che il macchinario batterico poteva essere usato per fare il cosiddetto editing genetico sono state l'americana Jennifer Doudna e la francese Emmanuelle Charpentier. La tecnica è stata però adattata alle cellule umane dal ricercatore cinese Feng Zhang.

Applicazioni di CRISPR/Cas9 alla ricerca biomedica

Nelle mani dei ricercatori Crispr/Cas9 è diventato uno strumento multiuso, l'equivalente molecolare di un coltellino svizzero dotato di bussola per orientarsi lungo il Dna, di morsa per legarsi a esso, forbici per tagliare e altri accessori ancora.

La tecnica può essere utilizzata in molti modi. Insieme alla delezione di interi geni, può servire ad introdurre nel genoma, in un punto preciso, un segmento estraneo, oltre a correggere i geni mutati in modo che tornino a funzionare bene.

Le potenzialità applicative della tecnica per la creazione di modelli sperimentali *in vitro* di rilevanza umana, che consentano di spostare il focus da una ricerca prevalentemente basata sui modelli animali ad una maggiormente incentrata sull'uomo, sono notevoli (Quinn et al. 2017).

CRISPR/Cas9 e cellule staminali umane come modelli per la ricerca

Le tecniche di editing genomico possono essere utilizzate per ingegnerizzare cellule staminali umane comprese le staminali indotte, con specifiche mutazioni geniche introdotte o corrette. Il fatto di poter utilizzare cellule provenienti dallo stesso paziente e quindi con lo stesso corredo genetico e di poterle modificare in modo mirato, introduce enormi potenzialità per lo studio di comuni malattie umane multifattoriali e poligeniche come diabete, malattie cardiovascolari, schizofrenia ed autismo (Hsu 2014).

Grazie agli studi di *large scale genome wide association* è stato possibile associare la presenza di determinate varianti genetiche ad alcune condizioni e malattie umane multifattoriali (Pearson 2008,

Manolio 2010). Abbinando le informazioni scaturite dai più recenti studi di *large scale genome wide association* con le nuove tecniche di *editing* genomico e con le cellule staminali pluripotenti indotte è possibile indagare circa l'influenza di determinate varianti genetiche (polimorfismi) sullo sviluppo di malattie umane complesse (Grobarczyk et al. 2015, Xue et al. 2016).

Organoidi umani ingegnerizzati con CRISPR/Cas9 come modelli sperimentali per la ricerca

Come visto in precedenza, gli organoidi sono strutture tridimensionali derivanti da cellule staminali adulte, embrionali o indotte, che ricapitolano molte caratteristiche funzionali e strutturali degli organi *in vivo*.

Combinando lo sviluppo di modelli *in vitro* con organoidi e le tecniche di *editing* genetico è possibile creare modelli di patologie umane per cui siano noti i difetti genetici oppure osservare l'effetto di determinate alterazioni geniche sullo sviluppo di un organo (Driehuis e Clevers 2017).

5.4. Alternative agli anticorpi monoclonali: gli affimeri

Anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali costituiscono un insieme di anticorpi identici fra loro in quanto sono prodotti da linee cellulari provenienti da un solo tipo di cellula immunitaria (quindi un clone cellulare). Data una qualsiasi molecola in grado di essere riconosciuta dal sistema immunitario (antigene), è possibile creare uno o più anticorpi monoclonali in grado di legare specificamente l'antigene, questo implica la possibilità di individuare, neutralizzare o purificare la sostanza in oggetto. Questa importante caratteristica degli anticorpi monoclonali li rende uno strumento estremamente efficace in biochimica, biologia molecolare, diagnostica e medicina.

Produzione degli anticorpi monoclonali

Ogni specifico anticorpo, che riconosce una specifica zona dell'antigene (epitopo) è prodotto da una specifica plasmacellula, derivata dal linfocita B, una cellula del sistema immunitario. L'isolamento e la coltura *in vitro* di una cellula capace di produrre un singolo anticorpo rappresenta una fonte di anticorpi monoclonali (monospecifici). Tuttavia i linfociti B, quando sono coltivati *in vitro*, muoiono dopo brevissimo tempo, e quindi non possono essere una fonte per la produzione a lungo termine di anticorpi.

La tecnologia tradizionale e più utilizzata per la produzione dell'anticorpo monoclonale (metodica descritta da Köhler e Milstein nel '75) prevede l'utilizzo di animali quali topi, conigli, capre, asini, ecc. e comprende l'isolamento dei linfociti B, e la loro successiva fusione con cellule trasformate (cellule mielomatose), utili per le loro caratteristiche di maggior crescita e sopravvivenza. Molte delle risultanti cellule ibride (o ibridomi), che vengono coltivate *in vitro*, manterranno la capacità di vivere per un tempo più lungo, oltre a produrre grandi quantità dell'anticorpo monospecifico.

La fusione tra i linfociti B (provenienti dalla milza e dai linfonodi di un animale immunizzato, che viene per questo sacrificato) e il mieloma di topo (l'animale più usato), viene ottenuta in modo artificiale.

Il terreno su cui vengono fatte crescere le cellule ibride è di tipo selettivo, inibisce la crescita sia dei mielomi che delle cellule della milza non fuse, ma non dell'ibridoma.

Gli ibridomi vengono separati per tipologia e sono successivamente saggiati mediante specifici test per individuare quelli che sintetizzano l'anticorpo desiderato. Gli ibridomi così selezionati possono essere propagati *in vitro* e/o conservati in azoto liquido per poi essere utilizzati in un secondo momento.



Anticorpi monoclonali ricombinanti

Attraverso una tecnica chiamata *phage display* è oggi possibile costruire repertori di anticorpi monoclonali ricombinanti bypassando totalmente l'utilizzo di animali.

Phage display è una tecnica di laboratorio per lo studio delle interazioni proteina-proteina, proteina-peptide e proteina-DNA che usa dei batteriofagi o fagi (virus che infettano batteri) per collegare le proteine con le informazioni geniche che codificano per esse (Smith 1985). Con questa tecnica, sviluppata a partire dal 1985, il gene codificante per la proteina d'interesse è inserito nel gene di una proteina di rivestimento del fago causando l'esposizione della proteina sull'esterno del fago mantenendo il gene di quella proteina all'interno, instaurando una connessione tra genotipo e fenotipo. I fagi recanti la proteina d'interesse possono quindi essere sottoposti a screening con altre proteine, peptidi o sequenze di DNA con l'obiettivo di individuarne possibili interazioni. In questo modo una vasta quantità di proteine può essere saggiata e amplificata in un processo di selezione in vitro.

Queste ampie collezioni di varianti anticorpali (nell'ordine di complessità di 10⁸-10¹⁰) "mimano" la variabilità del sistema immunitario animale, fornendo la possibilità di selezionare molecole ad alta affinità e specificità in modo molto più semplice, economico ed eticamente accettabile rispetto al sistema classico di isolamento di immunoglobuline attraverso l'immunizzazione di animali.

I problemi degli anticorpi

Sebbene gli anticorpi siano oggi universalmente utilizzati in diverse applicazioni nel campo della biochimica, biologia molecolare, diagnostica e medicina, dall'analisi di oltre 5400 anticorpi provenienti da 51 differenti produttori è emerso che più della metà fallisce a legarsi al target con l'affinità o la specificità richieste per uno o più saggi (Berglund et al. 2008, Gold et al. 2010). Esistono inoltre enormi variazioni da lotto a lotto, cosa che mette in crisi la riproducibilità degli esperimenti (Bradbury e Plückthun 2015).

Visti i rapidi progressi della biologia molecolare negli ultimi anni, sono necessari nuovi reagenti per riconoscere e legare le proteine. Una revisione di 20 milioni di pubblicazioni dal 1950 al 2009 ha dimostrato che i tre quarti delle ricerche erano focalizzate soltanto su quel 10 per cento di proteine note prima della mappatura del genoma umano (Edwards et al. 2011). Nonostante ciò, nel 2005 presso il MRC Cancer Cell Unit di Cambridge e poi all'Università di Leeds furono prodotte le prime alternative innovative agli anticorpi, gli "Affimers" o in italiano Affimeri (Woodman et al. 2005, Hoffmann et al. 2010, Stadler et al. 2011, Tiede et al. 2014).

Affimeri: una valida alternativa agli anticorpi

Gli affimeri sono proteine ingegnerizzate che possiedono tutte le caratteristiche desiderabili degli anticorpi come l'alta specificità ed affinità, mentre non presentano i problemi notoriamente associati con gli anticorpi come ad esempio la cross-reattività e la fragilità.

Gli affimeri sono piccoli, resistenti a temperature e pH estremi, hanno affinità di legame simile a quella degli anticorpi e sono stabili quando si legano alle superfici. Ciò fa degli affimeri lo strumento ideale per quelle applicazioni che richiedono l'immobilizzazione di un reagente catturato, nonché l'utilizzo in una grande varietà di saggi che tradizionalmente utilizzano anticorpi (ad es. ELISA, Western Blot).

Affimeri specifici possono essere prodotti attraverso una selezione in vitro in molto meno tempo rispetto a quello necessario a produrre gli anticorpi e possono anche essere prodotti laddove sia impossibile produrre anticorpi: i target infatti non necessitano di essere immunogenici e non vi sono problemi di tossicità non essendoci alcun organismo animale o umano implicato nella loro produzione. Possono sostituire gli anticorpi in tutte le loro applicazioni, tra cui ELISA, citometria a flusso, immunistochimica, ecc. (vedi Avacta Life Sciences).

5.5. Alternative al siero fetale bovino (FBS) per le colture cellulari

Il siero fetale bovino, spesso indicato con la sigla FBS (o FCS, dall'inglese *fetal calf serum*, siero fetale di vitello) è un liquido costituito dalla frazione del plasma sanguigno che rimane dopo la coagulazione del sangue e quindi della conversione di fibrinogeno in fibrina. Il siero fetale bovino è un prodotto secondario dell'industria della carne, ottenuto dal sangue che viene raccolto dal feto di bovine gravide durante il processo di macellazione. Il siero viene aggiunto ai terreni di coltura per apportare fondamentali fattori di crescita, ormoni, chelanti e sostanze detossificanti che inducono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule in coltura.

Il siero di origine fetale è caratterizzato da una maggiore concentrazione di fattori di crescita e livelli inferiori di anticorpi rispetto al siero prelevato da un individuo adulto. Il siero fetale bovino è ad oggi il supplemento più utilizzato per il mantenimento in vitro di colture cellulari di cellule eucariote, ma presenta molteplici svantaggi:

1. il siero è un integratore mal definito, e quindi rappresenta un fattore non prevedibile nella coltura cellulare e poco ripetibile (ogni lotto di siero è diverso, come è diverso ogni animale da cui proviene il siero) (Bjare 1992, Gstraunthaler 2003);
2. i lotti di siero mostrano variazioni quantitative e qualitative nella loro composizione e quindi introducono una variabilità grave da lotto a lotto rendendo gli esperimenti (e quindi i risultati) non scientificamente riproducibili (Price e Gregory 1982);
3. il siero può essere anche una potenziale fonte di contaminanti quali batteri, funghi, micoplasmi, virus o prioni (Dormont 1999, Eloit 1999, Wessman 1999);
4. le proteine del siero possono legarsi a farmaci o agenti tossici alterando i risultati dei test;

Quindi, il siero presenta diverse variabili sconosciute nel sistema di coltura (Stoll e Spector 1984, Even et al. 2006, Lindl e Gstraunthaler 2008) rendendo gli esperimenti poco attendibili perché non riproducibili esattamente con le stesse condizioni.

Inoltre, i terreni di coltura siero-integrati possono essere incapaci di sostenere la crescita di specifici tipi di cellule, o di promuoverne una crescita eccessiva (Taub 1990).

Recentemente, gravi preoccupazioni etiche sono state sollevate per quanto riguarda il benessere dei feti donatori nella raccolta, la produzione e la lavorazione dell'FBS. Le preoccupazioni si sono concentrate principalmente sulle attuali modalità di raccolta dell'FBS che possono causare sofferenza agli animali utilizzati, in particolare i feti (Shailer e Corrin 1999, van der Valk et al. 2004 e 2010, Tekkatte et al. 2011, 3R CCAC).

Per ovviare a questo genere di inconvenienti relativi all'uso dell'FBS, sono stati sviluppati terreni di coltura cellulare di derivazione non animale capaci di ridurre fortemente o anche sostituire completamente il siero fetale bovino (Witzeneder 1990, Woehrling 2013) come ad esempio il lisato piastrinico umano (Rauch et al. 2011, Zen-bio <http://www.zen-bio.com/products/serum/fetal-bovine-serum.php>) oppure, i sieri artificiali, che ora molte compagnie stanno sviluppando per ovviare alle differenze tra lotti ed alla contaminazione.

I benefici della sostituzione del siero animale sono numerosi, tra cui aspetti biologici e specifici per le colture cellulari:

- ✓ Condizioni di coltura in vitro chimicamente definite e controllate;
- ✓ Ridotta variabilità nella composizione dei terreni di coltura;
- ✓ Riduzione dei rischi di contaminazione (micoplasma, virus, prioni);
- ✓ Vantaggi nell'isolamento dei prodotti di coltura cellulare (down-stream processing);

- ✓ Standardizzazione dei protocolli a causa della natura quantificabile e riproducibile dei terreni di coltura non animali, indipendenti dai problemi di batch riscontrati con l'uso di siero animale.

Gli svantaggi sono la scarsa diffusione di tali terreni di coltura e quindi la mancanza di protocolli adeguati ed ottimizzati per tutti i tipi cellulari.

Bibliografia

3R, CCAC. Fetal Bovine Serum – <http://3rs.ccac.ca/en/testing-and-production/tp-production/fetal-bovine-serum.html>

Bradbury, A. Plückthun, “Reproducibility: Standardize antibodies used in research,” *Nature*, 518:27-29, 2015.

Shailer C, Corrin, K. (1999). Serum supply: policies and controls operating in New Zealand. *Dev. Biol. Stand.* 99, 71-77 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404878>

Tekkotte C. et al. “Humanized” stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int.* 2011;2011:504723. doi: 10.4061/2011/504723. Epub 2011 Apr 3 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603148>

van der Valk J. et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro.* 2004 Feb;18(1):1-12 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630056>

van der Valk J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro.* 2010 Jun;24(4):1053-63. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016. Epub 2010 Mar 31 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362047>

Witzeneder K. et al. Human-Derived Alternatives to Fetal Bovine Serum in Cell Culture. *Transfus Med Hemother* 2013;40:417-423 (DOI:10.1159/000356236) – <http://www.karger.com/Article/FullText/356236>

Woehrling EK et al. Brain-derived neurotrophic factor as an indicator of chemical neurotoxicity: an animal-free CNS cell culture model. *Altern Lab Anim.* 2013 Dec;41(6):503-11

ZenBio. Human Serum & Animal-Free Growth Supplement - <http://www.zenbio.com/products/serum/fetal-bovine-serum.php>

5.6. Stampanti e bio-stampanti tridimensionali (3D) (a cura di Valentina Marchi)

Il salto di qualità della stampante tridimensionale (3D), rispetto a quella 2D, risiede nel funzionamento: nella stampa 3D viene usata una tecnica additiva che permette di sovrapporre uno strato sull'altro diversi materiali creando così oggetti tridimensionali a partire da un'immagine digitale 3D e dall'integrazione con un software. La biostampante è una speciale stampante 3D che utilizza materiale biologico vivente (cellule umane) come “inchiostro” e permette di stampare simultaneamente diversi tipi di cellule disponendole secondo una precisa architettura, proprio come si trovano in un tessuto umano.

Il funzionamento delle biostampanti è molto semplice: viene utilizzato un *bioink* costituito dalle cellule che viene depositato su una speciale carta, definita *biopaper* (gel biocompatibile), strato su strato formando delle strutture tridimensionali (le cellule possiedono la capacità di fondersi tra loro quando sono in contatto l'una con l'altra). In termini tecnici, nell'insieme questi processi è definito “tecnica delle 3 B”, che comprende:



- il *bioprinter*: cioè lo strumento, quindi una stampante 3D;
- il *bioink*: rappresenta invece il materiale usato per creare il prodotto, ed è costituito da materiale semiliquido cellulare;
- il *biopaper*: rappresenta il materiale su cui viene depositato il *bioink*, in fase iniziale esso è liquido, in seguito diventa di una consistenza solida-gelatinosa; rappresenta un supporto temporaneo che serve come appoggio per le cellule del *bioink*.

In ambito medico-sanitario, l'uso della stampante 3D si fonde con i principi dell'ingegneria tissutale, una scienza che, sfruttando le conoscenze di diverse discipline quali la chimica, la biochimica, la medicina, l'ingegneria, la fisica e la matematica cerca di costruire tessuti biologici in vitro con lo scopo di utilizzarli per sostituire parti del corpo umano danneggiate o come modelli sperimentali per la ricerca (Zhang Zhang 2015). La stampa 3D può essere utilizzata anche per riprodurre modelli di riferimento per sviluppare nuove tecniche chirurgiche personalizzate o come guida per interventi chirurgici particolarmente delicati (Herrero et al. 2018).

I cardiocirurghi del Sant Thomas Hospital di Londra, sono riusciti a salvare la vita di una bambina grazie a una perfetta ricostruzione 3D del suo cuore. La bambina presentava una grave malformazione cardiaca e l'intervento per correggerla era particolarmente difficile e rischioso viste le piccole dimensioni del suo cuore: la perfetta ricostruzione 3D del cuore della piccola basata sulle immagini di risonanza magnetica e tomografia computerizzata ha consentito ai chirurghi di capire e toccare con mano la posizione precisa in cui agire, permettendo loro di operare in maggiore sicurezza e con le tecniche adeguate al caso specifico. Un altro caso simile è avvenuto nel Kentucky, dove un cuore tridimensionale ha aiutato un chirurgo a salvare la vita di un bambino di 14 mesi affetto da tetralogia di Fallot, una combinazione di quattro malformazioni congenite che comprendevano una trasposizione dei grossi vasi e un buco tra i ventricoli. La stampa in 3D consente ai medici di studiare in modo più approfondito e toccare con mano ogni tipo di frattura o lesione, valutando meglio i casi più difficili da affrontare.

In un contesto importante come quello sanitario, l'avvento della tecnologia 3D rappresenta una vera e propria rivoluzione. Stampare un cuore, un fegato, un dente secondo le specifiche del paziente senza problemi di compatibilità o funzionalità era impensabile fino a pochi anni fa, oggi si stanno costruendo le basi per fare in modo che questo diventi realtà; si tratta di un settore nuovo costellato di limiti ma che racchiude in sé potenzialità che meritano di essere considerate ed alimentate.

Le stampanti 3D rappresentano un'innovazione non solo in campo terapeutico (trapianti) ma anche soprattutto per la ricerca: se ancora si è in una fase troppo precoce per stampare, ad esempio, un polmone funzionante che possa essere trapiantato, è realtà la possibilità di riprodurre la pelle umana, su cui testare ad esempio la sicurezza di farmaci o prodotti cosmetici.

Diversi gruppi di ricercatori tra cui Wei Long et al. (2017) hanno prodotto pelle umana pigmentata da usare come modello sperimentale per la ricerca. I ricercatori hanno utilizzato strati di bio-inchiostri (componenti biologiche umane) depositati, rispettando l'ordine fisiologico del sistema cutaneo (Min et al 2017).

Con la crescita del settore, quando si giungerà a un livello di tecnologia maturo, si potranno perfino istituire aziende pubbliche o/e private finalizzate alla costruzione di queste bio-strutture che supportino ospedali, cliniche, università o studi privati.

'Organovo', una compagnia americana che si occupa della creazione di tessuti umani funzionanti, è stata tra i primi a proporre delle applicazioni pratiche di tessuti stampati in 3D; oltre a commercializzare tessuti umani con lo scopo di velocizzare i test pre-clinici relativi ai farmaci per consentire trattamenti più rapidi ed economici evitando così inutili rischi per i pazienti, nel 2014 l'azienda ha annunciato di aver prodotto il primo tessuto epatico attraverso la tecnica 3D. L'intenzione di Organovo è quella di replicare interi organi umani funzionanti che possano essere utilizzati a scopo di ricerca e in futuro addirittura trapiantati (<http://organovo.com/>).

All'università di Wollongong e del S.Vincent Hospital di Melbourne in Australia, il Bioprinting è stato utilizzato anche per la costruzione di cartilagine avvenuta prelevando cellule staminali da un paziente; la capacità delle cellule staminali di autoripararsi, le rende adatte alla cura dei traumi relativi all'apparato scheletrico (Cesaritti et al, 2014).

Visto che la principale limitazione dei tessuti stampati in 3D è la mancanza dei vasi sanguigni che apportano l'ossigeno ed il nutrimento ai tessuti, uno dei grandi obiettivi del Bioprinting è la realizzazione di vasi sanguigni e di tessuti vascolarizzati. Diversi ricercatori tra cui Moya e Brey (2012) e Bertassoni et al. (2014), Wei et al. (2017), hanno sviluppato vene e capillari artificiali e tessuti vascolarizzati avvalendosi della stampante 3D.

Un team di ricercatori del Laboratorio di Materiali Funzionali dell' ETH di Zurigo, ha costruito un cuore artificiale capace di pompare sangue. L'organo artificiale costruito per mezzo di una stampante 3D è interamente in silicone e non presenta parti meccaniche. Ovviamente, si tratta ancora di un prototipo che presenta molti limiti; il dispositivo cardiaco infatti ha un'autonomia limitata a circa 3 mila battiti, quindi non resiste per più di 40 minuti, ciononostante le potenzialità applicative sono enormi (Cohrs et al. 2017).

Duan et al. (2014) hanno ricostruito delle valvole cardiache interamente umane utilizzando la stampa 3D, un idrogel biocompatibile e cellule interstiziali valvolari aortiche umane.

In conclusione, le stampanti 3D sono diventate uno strumento al servizio della medicina moderna. Ci sono buone possibilità che in un futuro non lontano si potranno stampare cuore, fegato, reni, polmoni ma anche pelle e ossa, eliminando del tutto il problema del rigetto e della scarsità di organi disponibili al trapianto.

Bibliografia

Bertassoni et al., Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs, Lab on a Chip, 2014, DOI: 10.1039/C4LC00030G

Cesaritti, G. (2014). La tecnologia della stampa 3D in sanità.

Cohrs, N. H., Petrou, A., Loepfe, M., Yliruka, M., Schumacher, C. M., Kohll, A. X., ... & Stark, W. J. (2017). A Soft Total Artificial Heart—First Concept Evaluation on a Hybrid Mock Circulation. *Artificial Organs*.

Duan B, Kapetanovic E, Hockaday LA, Butcher JT. 3D Printed Trileaflet Valve Conduits Using Biological Hydrogels and Human Valve Interstitial Cells. *Acta biomaterialia*. 2014;10(5):1836-1846. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.005.

Herrero Antón de Vez H, Herrero Jover J, Silva-Vergara C. Personalized 3D Printed Surgical Tool for Guiding the Chisel during Hump Reduction in Rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2018 Feb 8;6(2):e1668.

Min D, Lee W, Bae IH, Lee TR, Croce P, Yoo SS. Bioprinting of biomimetic skin containing melanocytes. *Exp Dermatol*. 2017 Apr 28. doi: 10.1111/exd.13376.

Moya ML., Brey E.M. (2012) "Vascularization in Engineered Tissues". Book Chapter In: *Tissue Engineering: Principles and Practices*. CRC Press Editors: Mikos AG., Fisher JP., Bronzino JD., Peterson DR.

Wei Long, Qi JTZ, Yeong WY, Naing MW. Proof-of-concept: 3D bioprinting of pigmented human skin constructs. *Biofabrication*. 2018 Jan 23;10(2):025005.

Wei Zhu, Xin Qu, Jie Zhu, Xuanyi Ma, Sherrina Patel, Justin Liu, Pengrui Wang, Cheuk Sun Edwin Lai, Maling Gou, Yang Xu, Kang Zhang, Shaochen Chen, Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture, *Biomaterials*, Volume 124, 2017, Pages 106-115, ISSN 0142-9612



Zhang X, Zhang Y. Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting. Cell Biochem Biophys. 2015 Jul;72(3):777-82. doi: 10.1007/s12013-015-0531-x.

Conclusioni

È stata presentata una carrellata non esaustiva di metodologie moderne che potrebbero essere impiegate nella ricerca biomedica ai fini della riduzione o della sostituzione degli animali. È importante sottolineare che la chiave non sta tanto nelle singole metodologie, alcune delle quali non sono nemmeno tanto moderne ma nell'approccio, che dovrebbe essere *human based* ed integrato. Le metodologie descritte hanno cioè senso a livello di ricerca in medicina umana se e soltanto se vengono utilizzati dati e materiale biologico provenienti da *Homo sapiens* e vengono utilizzate in modo integrato. L'idea di sostituire un test su animale con un test in vitro (o in silico o in chemico) è altamente errata e fuorviante. Si parla di interi approcci *human based* integrati, ad esempio un modello microfisiologico di malattia su chip, integrato a studi di -omica, ed adottando le più moderne tecnologie come l'editing genomico avanzato, la stampa 3D, le tecniche di ingegneria tissutale, l'utilizzo di cellule staminali, ecc. Tante più risorse umane, sociali ed economiche verranno veicolate in tale direzione, tanto più la transizione sarà rapida, con beneficio per tutti, i pazienti in attesa di cure in primis.

Manuela Cassotta ha conseguito una laurea specialistica in Biologia marina e una laurea magistrale in Biotecnologie mediche presso l'Università degli Studi di Trieste. Ha svolto la sua tesi in Biotecnologie mediche presso l'Università degli Studi di Trieste su un modello in vitro di sindrome di Rett, basato su cellule staminali umane riprogrammate a partire dalle cellule dei pazienti. Grazie alla sua tesi ha vinto una borsa di studio con la quale ha portato avanti un progetto di ricerca e formazione presso i laboratori della Fondazione Callerio di Trieste, con cellule umane e tecnologie in vitro innovative come i bioreattori fluidici. I suoi interessi nella ricerca si focalizzano principalmente sui modelli sperimentali avanzati, sulla medicina rigenerativa e sulla divulgazione scientifica. È membro del comitato scientifico di O.S.A. – Oltre la Sperimentazione Animale.

Valentina Marchi ha conseguito una laurea magistrale in Neuroscienze e riabilitazione neuropsicologica presso l'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna con una tesi sul funzionamento cognitivo pre e post chirurgico in pazienti con neoplasia cerebrale maligna. Vincitrice di due borse di studio, grazie alle quali ha svolto ricerca presso l'Università di Ghent (Belgio) e l'Università Autonoma di Barcellona (Spagna). È impegnata nello studio di bio-marcatori responsabili dello sviluppo e della progressione del Mild Cognitive Impairment (MCI) e della malattia di Alzheimer presso l'Università di Sheffield (UK). I suoi principali interessi di ricerca riguardano il sistema sensori-motorio, le demenze corticali e sottocorticali e l'uso di strumenti di neuro-imaging, di elettrofisiologia e di stimolazione elettrica non invasiva del cervello.