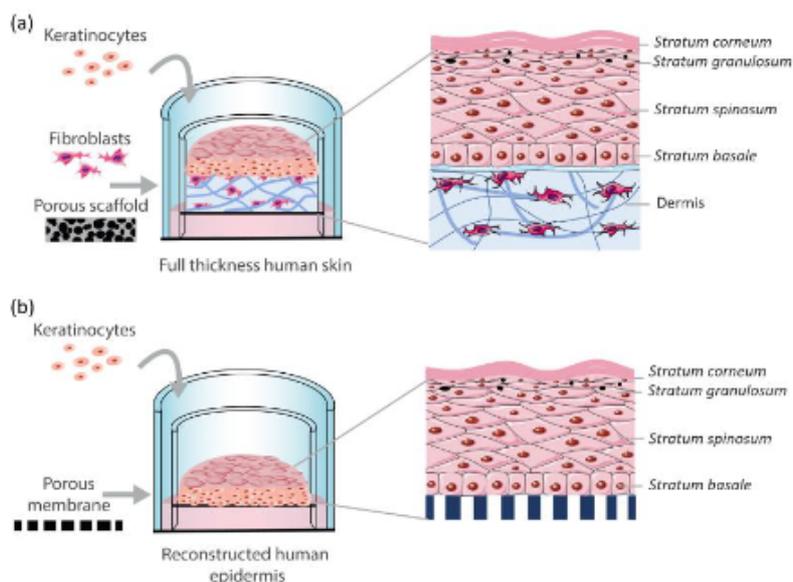


Cari Osanti ben trovati,  
 in questo numero ci occuperemo di un innovativo modello di cute a tutto spessore, mediante il quale vagliare in modo più accurato di quanto fatto fin ad ora, la tossicità delle formulazioni ad uso topico; concentreremo poi la nostra attenzione sullo stato dell'arte per quanto concerne gli organs on chips, cercando di capire quanto siano importanti sia per la ricerca biomedica di base che per quella specialistica, e cogliendo da ultimo le capacità integrative offerte da questi modelli nel riproporre le interconnessioni tra i diversi organi ed apparati. Infine ripercorreremo alcune tappe salienti nella critica alla sperimentazione animale degli ultimi decenni, con particolare attenzione alla revisione sistematica delle ricerche condotte su animali in fase preclinica; vedremo che molta strada è stata fatta e benchè tanta altra sia ancora da fare, ci sono non solo riconoscimenti concreti dei limiti e dei problemi attinenti ai modelli animali, ma ci sono chiare e autorevoli rivendicazioni da più parti sulla necessità non più derogabile di passare ad una ricerca con metodologie incentrate sull'uomo.

Un nuovo modello per vagliare tossicità ed efficacia dei farmaci ad uso topico

**ALTEX, accepted manuscript  
 published March 23, 2022  
 doi:10.14573/altex.2111182**



**Fig. 1: Schematic depiction of an open-source (a) full-thickness model (FTSm) and (b) reconstructed human epidermis model (RHEm)**

FTSm are generated using a porous polystyrene scaffold seeded with fibroblasts to recreate the dermal compartment and keratinocytes are seeded on top of the dermal compartment. RHEm are generated by seeding keratinocytes on top of a porous membrane. An air-liquid interface is established to generate a fully-differentiated epidermis with the layers present in the *in vivo* skin.

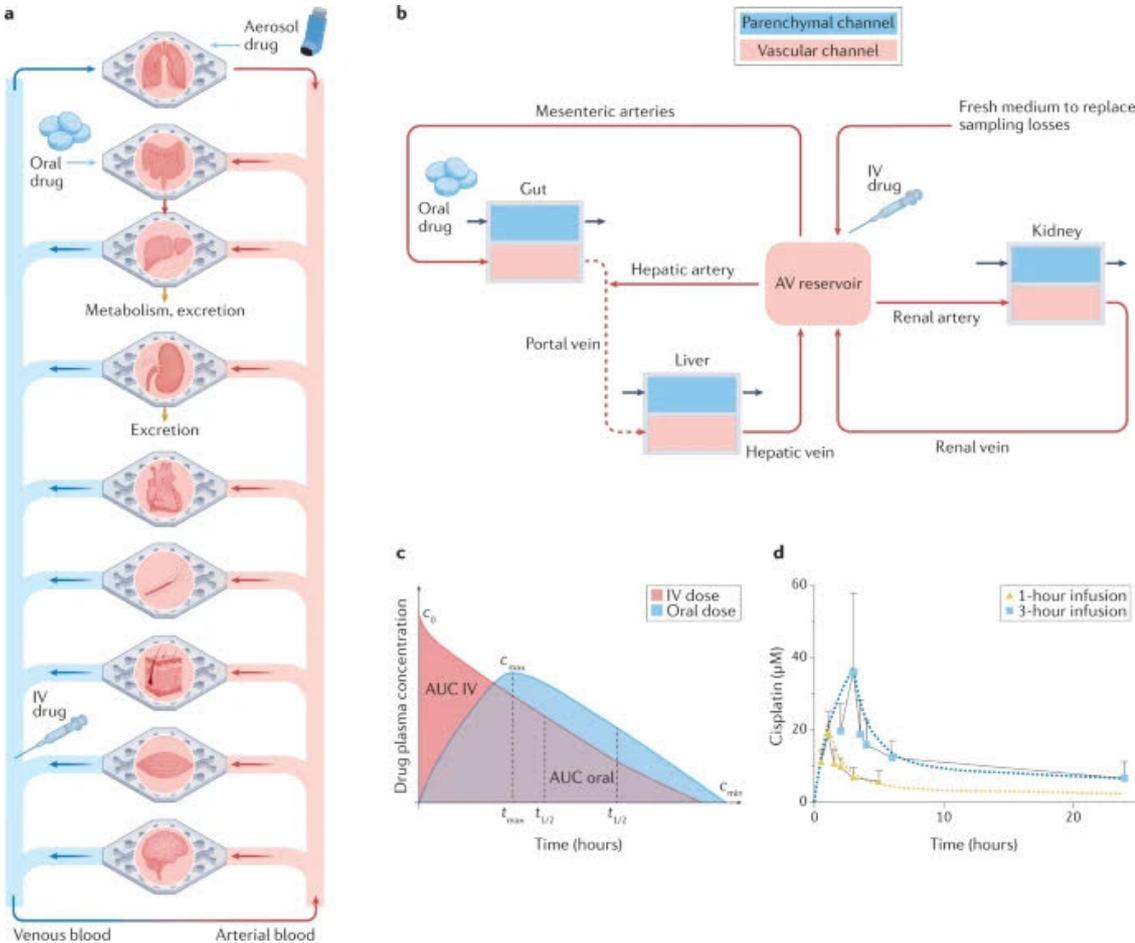
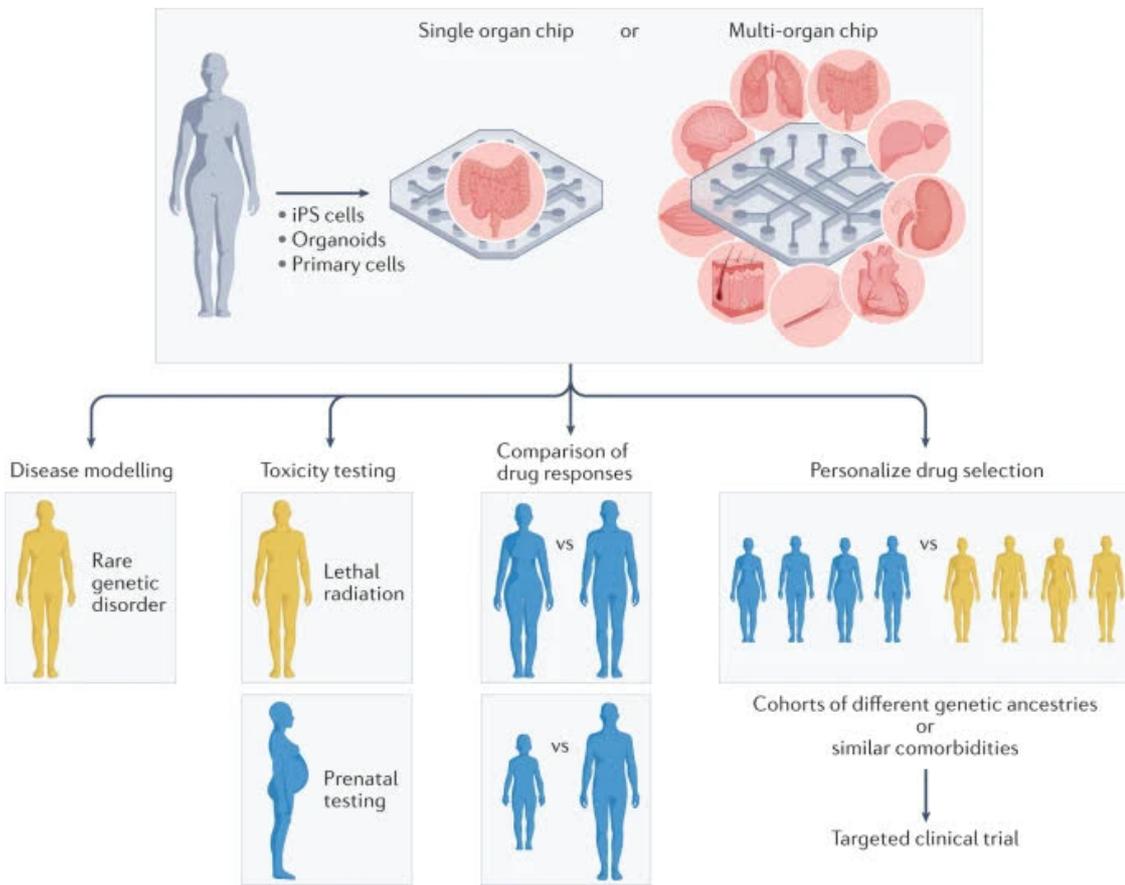
Le malattie della pelle rappresentano la quarta causa di morbilità non mortale nel mondo e affliggono circa un terzo della popolazione mondiale. Proprio per questa ragione la ricerca di farmaci per uso topico è in continuo sviluppo. Per quanto concerne la ricerca su modelli non animali, negli ultimi anni sono stati utilizzati sistemi costituiti da epidermide ricostruita, che erano tuttavia mancanti dell'importantissima barriera dermo-epiteliale oppure sistemi in cui lo strato dermico era presente, ma costituito da collagene di derivazione animale in cui vengono poi inseriti i fibroblasti; il risultato finale comporta la contrazione dello strato che poi si distacca e nel complesso il modello offre scarsa capacità di simulazione delle proprietà meccaniche e di assorbimento cutanee in vivo. Altri ostacoli al raggiungimento di una condizione sperimentale quando più possibile aderente alla realtà, sono dati dalla qualità dei materiali ordinati per la

ricostituzione dell'epidermide (spesso provenienti da molto lontano) e soprattutto dagli stessi protocolli che essendo più spesso secretati, rendono l'attività di ricerca più costosa e più lunga.

Si è dunque deciso di procedere alla realizzazione di un modello di risorsa fruibile da tutti, in cui oltre all'epidermide, fosse presente una matrice extracellulare di origine non animale volata a ricreare il derma. Per provare l'efficacia del modello il medesimo è stato comparato con quello costituiti dalla sola epidermide già in uso e di precedente validazione, entrambi sottoposti a test di irritazione per verificare la risposta della barriera cutanea. Sono stati condotti test di irritazione cutanea seguendo quanto previsto dalle linee guida OCSE e valutando la risposta mediante il test del MTT. Il test MTT consente di verificare la vitalità delle cellule attraverso la valutazione dell'attività mitocondriale residua, mediante valutazione colorimetrica (ovvero si valuta la capacità degli enzimi mitocondriali di elaborare una data sostanza chimica nota, con conseguente colorazione blu/violacea). Per meglio caratterizzare l'attività di barriera, i modelli sono stati sottoposti al test della resistenza transepiteliale. Sono stati fatti inoltre degli studi comparativi tra i diversi modelli per quanto concerne la permeazione delle sostanze. Il risultato ha evidenziato che il modello FTSM (full-thickness skin model) modello di cute a tutto spessore è in grado di riproporre caratteristiche strutturali e di barriera analoghe alla pelle umana. Pertanto se è pur vero che il modello RHEms (reconstructed human epidermis models) già validato e di uso comune, è risultato nel complesso più performante nei diversi test, è altrettanto vero che il modello FTSM ha dimostrato di possedere delle proprietà inerenti la barriera cutanea, che non ritroviamo in nessun altro modello commerciale attualmente in uso. Dunque con le ulteriori messe a punto del caso, il modello potrebbe diventare fondamentale per avere risposte sulla tossicità cutanea molto più complete e verosimili.

Zoio P, Lopes-Ventura S, Marto J, Oliva A. Open-source human skin model with an in vivo-like barrier for drug testing. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* 2022. doi: 10.14573/altex.2111182.

Presente e futuro degli organs-on-chip



Un'interessante ricerca ha esaminato lo stato attuale dei modelli di ricerca basati su organs on-chip, evidenziando tutti i traguardi raggiunti nelle diverse branche di ricerca (ricerca di base, tossicità, etc), e

con un occhio a quanto ancora deve essere fatto per far sì che gli organs on-chip non siano solo sostitutivi ma migliorativi, per una ricerca altamente specializzata e personalizzata. Dagli iniziali tessuti in 2D che mal si prestavano alla corretta riproduzione delle caratteristiche in vivo, si è giunti sino ai tessuti 3D ingegnerizzati volti a ricostituire i tessuti di uno più organi miniaturizzati; dalle forme iniziali con modelli statici, si è poi passati ai sistemi microfluidici che hanno consentito di ricapitolare con precisione e puntualità i meccanismi fisiologici e biochimici che si verificano in vivo. Sono dunque state create nei diversi organi delle interfacce utili a mimare quanto avviene in vivo in un alveolo, presso un tubulo renale, presso un sinusoidale epatico etc. Altro aspetto fondamentale è stato l'inserimento in sito delle cellule del sistema immunitario, che rappresentano da sempre una componente fondamentale nello sviluppo dei processi morbosi. Vediamo alcuni degli impieghi degli organs on-chips.

-organs on-chip di polmone: studio dei meccanismi edemigeni indotti dalla somministrazione dell'antitumorale IL-2; studio dei meccanismi di citotossicità in risposta alle nanoparticelle di ossido di zinco; studio della trombosi indotta dal LPS (lipopolisaccaride); ancora studio di forme asmatiche e della COPD (malattia cronica ostruttiva polmonare); della fibrosi cistica, del cancro, delle infezioni da SARS-CoV-2 e da vari ceppi virali dell'influenza A. In riferimento al SARS-CoV-2, le ricerche sugli organs on-chip di polmone hanno confermato quanto già visto nella pratica clinica: ad esempio l'antivirale remdesivir è in grado di bloccare la replicazione virale e alleviare i danni alla barriera epiteliale-endoteliale; mentre gli antimalarici cloroquina e idrossicloroquina non sono risultati efficaci.

-organs on-chip di fegato: studio dell'epatotossicità, del metabolismo e delle interazioni farmacologiche, delle infiammazioni e delle infezioni. Studi di interazione farmacologica sull'attività enzimatica, studi inerenti la variabilità di risposta tra soggetti diversi, studi su patologie virali come l'epatite B. Da sottolineare la presenza nei modelli di cellule parenchimali epatiche, di cellule endoteliali sinusoidali, di cellule di Ito e di cellule del sistema macrofagico, come quello di Kupfer.

-organs on-chips di intestino: fondamentale in primis lo studio del ruolo giocato dalla mobilità meccanica in tutte le risposte operate dalla mucosa; altrettanto importante è l'integrazione con le diverse specie batteriche presenti in sito, che hanno un ruolo così decisivo nei diversi processi biochimici.

-organs on-chips di linfonodo: in questo caso si è ricostruito a partire da cellule germinali periferiche, un modello di linfonodo con all'interno sia linfociti B che linfociti T. Non solo, si è provveduto poi all'inserimento di cellule presentanti l'antigene, che in presenza di opportuna stimolazione antigenica hanno determinato l'attivazione dei linfociti B a plasmacellule e altresì la produzione di anticorpi. Si è inoltre provveduto a testare terapie immunologiche su frammenti di tessuto derivanti da pazienti con patologia tumorale; lo scopo era esaminare il funzionamento specifico in sito e i limiti che si frappongono al raggiungimento di strategie decisive nella soppressione della forma cancerogena in atto.

Oggi esistono modelli on-chip di tantissimi organi: reni, cervello, occhio, osso, organi riproduttivi (chip di placenta e di ghiandola mammaria), vasi sanguigni, organi linfoidi.

Ma sono i sistemi multi organo, che in virtù della loro capacità di interconnettere tra loro i singoli organi, ci consentono di mimare le diverse interazioni e i diversi effetti che seguono l'assunzione o la somministrazione di un farmaco. E dunque è possibile con questi sistemi avere un modello della farmacocinetica e della farmacodinamica della sostanza in uso, che rappresentano elementi imprescindibili non solo per capire, ma altresì per approntare la terapia.

Come mai allora il loro uso non è ancora universalmente riconosciuto ?

-necessità di validare e riconoscere i metodi;

-frammentazione nell'uso;

-è fondamentale che tutti riconoscano l'impossibilità di sostituire i modelli animali in un modo qualunque, e la necessità che ciò avvenga tramite la definizione di organs on-chip specificatamente strutturati per singoli approcci di studio, ovvero formati per rispondere a domande di farmacocinetica/farmacodinamica e volti a misurare l'efficacia dei farmaci o in alternativa il loro profilo di sicurezza;

-altrettanto importante è utilizzare per lo studio di una patologia l'organ on-chip meglio configurato a ricreare le condizioni in vivo (le affezioni che colpiscono gli stessi organi lo fanno spesso in modo del tutto differente, dunque ad esempio se vogliamo studiare l'edema polmonare, avremo necessità di un modello dotato di epitelio alveolare ed endotelio, diversamente se vogliamo studiare la fibrosi polmonare necessiteremo della componente fibroblastica).

Quale sarà il contributo al futuro della ricerca?

-i modelli di organs on-chip potrebbero essere utilizzati per rispondere a tutte quelle domande che vanno ben oltre la mera sostituzione dei test condotti su animali. Consentendo ad esempio di identificare l'origine della tossicità parziale osservata in certi gruppi di individui, durante i trial di fase I o ancora le differenze riscontrate nella risposta uomo-donna, piuttosto che in sottogruppi geneticamente simili. Nello stesso tempo

la capacità di replicare questi fenomeni di tossicità specifica, si tradurrebbe nella possibilità di sperimentare composti alternativi a quelli di uso comune;

-potrebbe avere la sua utilità, almeno nella fase iniziale, la produzione di organs on-chip a partire da cellule animali. Potrebbe consentire a coloro che da sempre operano su modelli animali, uno step di passaggio a metodiche costituite da organs on-chip esclusivamente umani;

-ma il vero traguardo è rappresentato non solo dal superamento dei modelli animali, quanto dalla capacità che i modelli human based siano in grado di replicare quanto avviene nella clinica umana;

-i costi per approntare questo tipo di modelli sono ancora considerevoli e pertanto (per renderli appetibili dall'industria farmaceutica) devono essere altrettanto validi nel fornire risultati utili per la ricerca. Nel contempo alcune valutazioni approntate da alcune case farmaceutiche hanno mostrato che l'adozione di questi modelli di ricerca, porterebbe in ultimo ad un risparmio economico che si aggira intorno al 25% dei costi investiti in ricerca e sviluppo.

La FDA ha fatto partire il progetto pilota IStand (Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs) che consente la qualificazione dei modelli di organs on-chip e una corsia preferenziale per la loro validazione.

I modelli di organs on-chip potrebbero rispondere a tutte le domande inerenti le diversità di genere, quelle esistenti tra adulti e bambini, quelle presenti in gravidanza e ancora quelle di individui appartenenti a gruppi genetici distinti; nonché simulare la presenza di comorbidità e la possibilità di testare sostanze con potenziale tossico sconosciuto.

Ingber DE. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nature Reviews Genetics* (2022). <https://www.nature.com/articles/s41576-022-00466-9>

L'importanza della revisione sistematica nella critica alla ricerca preclinica condotta sugli animali



Foto in <http://www.unife.it/medicina/ostetricia/studiare/minisiti/metodologia-della-ricerca-deontologia-professionale/igiene-generale/2019-2020/lez8-presentazione-sulla-metanalisi.pdf>

Nel 1012 il medico persiano Ibn Sina, disquisendo in merito all'utilizzo di animali per lo sviluppo di medicinali ad uso umano, aveva lanciato questo monito: "gli esperimenti devono essere eseguiti sul corpo umano. Se sono eseguiti sugli animali il rischio di fallire è duplice: una medicina potrebbe essere calda in riferimento al corpo umano e fredda rispetto a quello di leone o di un cavallo.....la seconda ragione sta nel fatto che la qualità della medicina potrebbe avere sul corpo umano effetti differenti da quelli visti negli animali".

L'attualità di queste parole si è potuta meglio apprendere un millennio dopo, quando soprattutto a partire dal 1989 ma maggiormente dal 2000 in poi, si è fatta largo l'idea della revisione sistematica dei materiali di ricerca. Lo scopo è quello di riesaminare anche alla luce dei risultati clinici, la validità delle ricerche e poter così valutare prospetticamente e sinteticamente (valutazione di tutto il materiale riferito a quel dato argomento) tutto quanto è stato prodotto in un'ottica critica e pragmatica. Nel 2004 Pound et al. pubblicano un articolo intitolato "Dove sono le evidenze che la ricerca sugli animali ha effetti benefici per l'uomo?". Gli autori sostengono che ci sono pochi dati a sostegno dell'uso degli animali nella ricerca e che mediante la revisione sistematica degli studi su animali si possa rispondere efficacemente alla domanda iniziale da cui sono partiti. Sebbene inizialmente la reazione più comune da parte della stessa comunità scientifica sia stata di forte critica e di prosecuzione dell'asserzione più spesso immotivata delle ragioni pro utilizzo degli animali nella ricerca, il documento ha consentito l'avvio di una serie di revisione sistematiche di studi preclinici condotti su animali. Non solo, sempre nel 2004, all'Università di Edimburgo sotto la guida del neurologo Macleod nacque il CAMARADES (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies). Il progetto nacque con lo scopo di revisionare i materiali di ricerche che prevedevano l'utilizzo in ambito preclinico degli animali e ben presto si trovò a sostenere a sua volta altri progetti che si muovevano in tal senso. Si prese le mosse dagli studi preclinici sui farmaci post ischemici, ma si estese ben presto lo studio anche ad altre patologie. Attualmente il progetto, con cinque centri di coordinamento nazionali e partecipanti da tutto il mondo, continua la sua attività di revisione e meta analisi delle ricerche su animali. Nel 2007 sono stati pubblicati i risultati della revisione e del confronto tra studi condotti su animali in fase preclinica e studi clinici sull'uomo. Sono state prese a riferimento 6 diverse aree di patologia, i cui effetti sull'uomo erano ben conosciuti sulla base delle revisioni operate: corticosteroidi per danno cerebrale, corticosteroidi prenatali per distress respiratorio neonatale, bifosfonati per l'osteoporosi, antifibrinolitici per le emorragie, trombolitici e agenti neuroprotettivi (tirilazad) per gli ictus. A questo punto sono stati raccolti ed esaminati tutti gli studi condotti su animali per i medesimi argomenti (pubblicati e non) e sono stati sottoposti a revisione. I risultati sono stati i seguenti:

- i bifosfonati per l'osteoporosi e i trombolitici per l'ictus davano effetti concordi negli studi sugli animali e in quelli clinici sull'uomo;
- i corticosteroidi prenatali usati contro il distress nel parto prematuro, si sono tradotti in risultati solo parzialmente concordanti negli studi;
- mentre i corticosteroidi per il danno cerebrale, gli antifibrinolitici per le emorragie e il Tirilazad come neuroprotettivo in corso di ictus, hanno mostrato sugli animali effetti totalmente discordi da quelli conosciuti nell'uomo.

Nel 2006 la veterinaria Merel Ritskes-Hoitinga fonda il centro 3R (Replacement, Reduction, Refinement) che però a suo avviso non sarà in grado di dare le risposte sperate e dunque insieme ad altre eminenti figure nel 2012 fonda all'università di Radboud in Olanda, il SYRCLE ovvero il centro di revisione sistematica per la sperimentazione sugli animali da laboratorio. Dall'introduzione del metodo di revisione sistematica si è calcolato che gli animali utilizzati nel laboratorio dell'Università siano diminuiti del 35%, mentre nell'intero paese del 15%.

Gli studi di revisione sistematica operati da varie figure tra cui Hoitinga, hanno portato negli anni ad evidenziare quanto segue:

- le ricerche condotte in fase preclinica sugli animali sono spesso di scarsa qualità e tendono ad omettere tutta una serie di dati che potrebbero mostrare le reali differenze in essere con l'uomo;
- la teorizzazione della ricerca è scadente e l'impianto scientifico seguito spesso poco rigoroso, con risultati poco affidabili e dunque con una clinica poco rilevante;
- vengono evidenziati solo i risultati e gli outfit positivi, che ricevono così eccessivo peso e significato nel computo globale (questo sia nei report, che nelle presentazioni rivolte ad enti di valutazione);
- i report sono incompleti con dati mancanti come ad esempio il numero di animali utilizzati, il numero di quelli deceduti o degli esclusi;
- si utilizzano più spesso piccoli animali, con risultati finali scarsamente traslabili al genere umano;
- la numerosità del campione in uso è inappropriata;
- si assiste ad una crisi della riproducibilità, gli esperimenti infatti non sono ripetibili;

-la traslabilità animale-uomo varia da 0 a 100 in modo casuale, senza fattori che ne possono aumentare la predittività;

Dalla collaborazione di Pound e Hoitinga ne è derivata nel 2018 una chiara affermazione che ribadiva come quand'anche tutti i problemi interni alla ricerca sugli animali venissero risolti, le differenze di specie sarebbero tali da non consentire ugualmente la loro applicazione sull'uomo.

Sappiamo oggi che la ricerca preclinica sugli animali manca non solo di validità interna (metodologie di ricerca, progetto, report etc) ma altresì esterna, in ragione delle differenze di specie e dell'impossibilità di riprodurre la complessità delle patologie umane.

Ma se l'evidenza sulle nuove metodologie human based dovrebbe aver già da tempo per lo meno indotto riflessioni sui modelli in uso, pare che i ricercatori siano in proposito piuttosto riluttanti ad abbandonare i vecchi modelli. Ottanta ricercatori che si occupano comunemente della ricerca sugli ictus, sono stati intervistati sulle problematiche esistenti nella ricerca preclinica in ragione delle differenze di specie, di tutti loro uno soltanto ha detto di aver spostato il suo focus d'attenzione su metodologie incentrate sull'uomo. Ma le cose stanno cambiando, assistiamo alla chiusura dei laboratori di sperimentazione animale di alto profilo nel Regno Unito, all'Olanda che è in primo piano nella corsa alla transizione verso una ricerca human based, all'impegno degli Stati Uniti nel porre fino all'impiego degli animali nei test di tossicità e ancora al voto in Europa lo scorso settembre 2021 per sviluppare un piano coordinato, volto a rimpiazzare gli esperimenti su animali con metodologie innovative che prescindano dal loro impiego. Gli autori si chiedono se tutto ciò non sia il preludio di una rivoluzione scientifica in arrivo.

Ritskes-Hoitinga M, Pound P (2022). The role of systematic reviews in identifying the limitations of preclinical animal research, 2000 – 2022. JLL Bulletin: Commentaries on the history of treatment evaluation (<https://www.jameslindlibrary.org/articles/the-role-of-systematic-reviews-in-identifying-the-limitations-of-preclinical-animal-research-2000-2022/>)