

Nuovi Approcci Metodologici: verso una ricerca biomedica scientificamente valida ed eticamente sostenibile

New Approach Methodologies: towards a scientifically sound and ethically sustainable research

MANUELA CASSOTTA

biologa, coordinatore scientifico Oltre la Sperimentazione Animale (OSA), Medical writer

Per corrispondenza:
manuela.cassotta@oltrelasperimentazioneanimale.eu

Riassunto

Molte delle malattie del nostro tempo, come l'ictus, le malattie cardiache, il cancro e l'Alzheimer, sono ancora poco conosciute dal punto di vista patogenetico e rimangono senza cure realmente efficaci. Lo sviluppo di un nuovo farmaco può richiedere dai 10 ai 15 anni e circa 2 miliardi di euro, e i tassi di fallimento si verificano in circa il 95% degli studi sull'uomo. Questo fallimento è stato almeno in gran parte attribuito all'inadeguatezza degli attuali modelli preclinici. Gran parte della ricerca biomedica e tossicologica è infatti convenzionalmente basata sull'uso di sistemi in vitro semplicistici o modelli animali che non sono in grado di ricapitolare adeguatamente le complesse condizioni fisiopatologiche umane. La ricerca sugli animali pone anche importanti preoccupazioni etiche. Durante l'ultimo decennio, si sono verificati straordinari progressi nell'ingegneria tissutale, nelle tecniche di coltura delle cellule staminali e nell'informatica. Questi hanno dato origine a una serie di metodi innovativi basati sulla biologia umana (human-based). Tali strumenti, noti anche come "Nuovi Approcci Metodologici" (NAMs), che comprendono organoidi derivati dal paziente, organi su chip, insieme all'analisi e ai modelli computazionali, si sono già dimostrati più efficienti e fisiologicamente rilevanti dei metodi tradizionali. I NAMs rappresentano strumenti nuovi ed entusiasmanti per portare avanti la ricerca biomedica con una prospettiva incentrata sulla biologia umana. Dopo una breve introduzione ai limiti dei metodi tradizionali, in questo articolo descrivo alcuni esempi dei principali NAMs disponibili e emergenti. L'obiettivo è incoraggiare la discussione sull'opportunità di esplorare percorsi innovativi nella ricerca biomedica e promuovere un cambio di paradigma verso un approccio più

incentrato sulla biologia umana. Ciò permetterebbe di comprendere meglio i meccanismi di malattia e sviluppare strategie preventive o terapeutiche mirate e più efficaci e di sostituire gli animali attualmente impiegati per la ricerca biomedica.

Parole chiave: sperimentazione animale, nuovi approcci metodologici, ricerca senza animali, metodi alternativi

Abstract

Many of the major diseases of our time, such as stroke, heart disease, cancer, and Alzheimer's, remain poorly understood and lack adequate treatments. A novel drug can take 10 to 15 years and about 2 billion euros to develop, and failure rates occur in about 95 percent of human studies. This failure has been at least largely attributed to the inadequacy of current preclinical models. Much of biomedical and toxicological research has been conventionally based on the use of simplistic in vitro systems or animal models which do not adequately mimic complex human physio-pathological conditions. Animal research also poses important ethical concerns. During the last decade, extraordinary advancement in tissue engineering, stem cell culturing, nucleotide sequencing technologies, and computer science has occurred, which has originated an array of innovative human-based and more physiologically-relevant tools. These tools, also known as "new approach methodologies" (NAMs), which comprise patient-derived organoids, organs-on-chip, along with computational analysis and models, have already proved to be more efficient than traditional methods, representing novel and exciting tools to forward biomedical research from a human-biology-focused perspective. After a brief introduction on the limits of traditional methods, here I

describe some examples of the main novel available and emerging NAMs. The aim is to encourage discussion on the opportunity to explore innovative paths in biomedical research and to promote a paradigm-shift towards a more human biology-focused approach to better understand human physiopathology and to develop more effective targeted preventive or therapeutic strategies, while replacing animals employed for biomedical research.

Keywords: animal testing, new approach methodologies, animal-free research, alternative methods

■ Introduzione

Tradizionalmente la ricerca biomedica e tossicologica si è basata su modelli in vitro semplicistici (ad es. linee cellulari animali o umane coltivate in un ambiente statico e bidimensionale) e/o modelli animali. Nonostante le ingenti risorse spese nella ricerca su malattie devastanti quali ad es. quelle cronico-degenerative, queste continuano ad essere importanti cause di sofferenza e morte. Un nuovo farmaco può impiegare dai 10 ai 15 anni e circa di 2 miliardi di euro per essere sviluppato. L'attuale tasso di fallimento nel processo di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci è superiore al 90%, ciò significa che oltre il 90% dei potenziali farmaci risultati sicuri ed efficaci negli studi preclinici (in vitro e sugli animali) risulta poi inefficace o tossico negli esseri umani¹.

Questo fallimento è stato almeno in buona parte attribuito all'inadeguatezza dell'attuale paradigma di ricerca, basato su modelli in vitro semplicistici e/o modelli animali². I modelli in vitro tradizionali sono infatti solitamente basati su colture cellulari statiche e bidimensionali, che non sono in grado di mimare le condizioni che si verificano in vivo, quali ad esempio il cross-talk con altri tessuti ed organi, gli stimoli meccanici del flusso e del movimento, ecc. con conseguente impossibilità a fornire risposte sistemiche fisiologicamente rilevanti. Inoltre spesso vengono utilizzate linee cellulari immortalizzate, che per loro natura presentano importanti differenze nel cariotipo e nell'espressione dei geni, rispetto alle cellule ottenute da colture primarie. I modelli animali non sono in grado di mimare la complessità delle condizioni umane a causa delle differenze interspecifiche nei meccanismi fisiopatologici, delle condizioni artificiali di vita in laboratorio e delle modalità artificiose di induzione di sintomi di malattie tipicamente umane.

I notevoli progressi nelle biotecnologie, nella microingegneria, microfluidica, informatica, nella potenza di calcolo e nella rispettiva cooperazione multidisciplinare, hanno consentito lo sviluppo di Nuovi Approcci Metodologici (NAMs), inaccessibili solo fino a pochi anni fa³. In questo articolo vengono presentati soltanto alcuni tra i più importanti NAMs basati sulla biologia umana disponibili ed emergenti, con i relativi esempi di applicazione nella ricerca biomedica.

■ I Nuovi Approcci Metodologici “human-based”

I “Nuovi Approcci Metodologici” (NAMs) sono originariamente stati definiti come quelle tecnologie, metodologie, approcci avanzati che possono essere utilizzati per ottenere informazioni sul rischio associato alle sostanze chimiche e che non prevedono l'uso di animali vertebrati vivi⁴. La loro applicazione però si estende anche oltre lo studio degli effetti delle sostanze chimiche e spazia dalla ricerca biomedica alla didattica³. Gli approcci “human-based”, in italiano “basati sull'uomo”, riguardano metodologie basate sulla biologia umana, focalizzate su dati, materiali, cellule, tessuti, organi, organismi, popolazioni umani. I termini sono spesso usati come sinonimi anche se in realtà non lo sono poiché i NAMs si riferiscono perlopiù a tecnologie emergenti e a volte contemplano anche l'impiego di forme di vita a minor sviluppo neuro-cognitivo come larve di pesce, organismi invertebrati, ecc. per effettuare studi a livello meccanicistico. In questo articolo verranno trattati soltanto i NAMs human-based.

■ Cellule e tessuti umani

I tessuti provenienti dal paziente (da donatori sani o pazienti, ex vivo da biopsie, interventi chirurgici, post-mortem, ecc.) costituiscono la fonte ideale per allestire modelli fisiologicamente rilevanti per la ricerca. Ad es. una co-culture di cellule mononucleate da sangue periferico umano con espianti di cute autologa presi da donatori si sono dimostrate in grado di mimare il danno provocato da TGN1412 che nel 2006 portò in fin di vita 6 volontari della fase clinica⁵, e che non era stato previsto dai precedenti studi su animali (topi, conigli, ratti, e Primati non umani). I tessuti umani possono essere anche ricostituiti in vitro a partire dai singoli tipi cellulari, mirando a riprodurre l'architettura originaria del tessuto in vivo. Un importante limite nell'utilizzo di tessuti umani freschi è la loro scarsa accessibilità e limitata sopravvivenza in vitro. Grazie ai recenti sviluppi delle nuove tecniche di stampa 3D, è oggi possibile la ricostituzione di diversi tessuti umani con un livello di precisione elevato, per la ricerca scientifica. Esempi di tessuti ricostituiti in 3D sono l'epidermide⁶, l'epitelio corneale, orale e gengivale, l'epitelio vaginale e delle vie respiratorie, il tumore al polmone. Quest'ultimo viene utilizzato con successo nello studio dell'efficacia di farmaci o anticorpi a scopo terapeutico (farmaci biologici), rilevamento di biomarcatori di malattia ed efficacia terapeutica, studi di tossicità acuta e cronica, rilascio di farmaci somministrati per via inalatoria o sistemica, studio dei meccanismi di resistenza tumorale, ecc. (figura 1)⁷.

■ Cellule staminali umane pluripotenti indotte (IPS) e organoidi umani

Le cellule staminali pluripotenti sono cellule “immature” in grado di differenziarsi nei diversi tipi cellulari che compongono l'organismo. Visto che normalmente

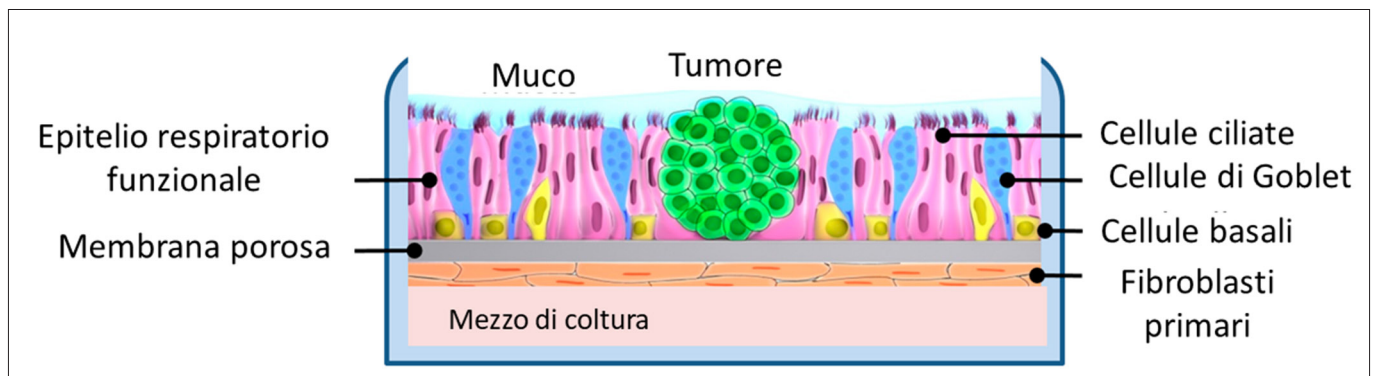


Figura 1. Esempio di modello di cancro al polmone ricostituito: epitelio respiratorio in co-coltura con fibroblasti polmonari e cellule di adenocarcinoma polmonare umano (<http://www.epithelix.com/products/oncocilair>).

questo tipo di cellule si trova all'interno dell'embrione ai primi stadi di sviluppo, fino a non molti anni fa, per l'ottenimento di cellule staminali pluripotenti umane sarebbe stato necessario distruggere degli embrioni umani; ciò che ne limita molto l'utilizzo per questioni etiche. Grazie alle scoperte del gruppo del Prof. Yamanaka dell'Università di Kyoto (Giappone, 2007), oggi le cellule staminali pluripotenti possono essere ricavate in modo non invasivo direttamente a partire dalle cellule del paziente, ad esempio quelle del derma della pelle, ed indotte a differenziarsi in vitro nei vari tipi cellulari del corpo umano senza dover ricorrere agli embrioni. Tali cellule, prendono il nome di "cellule staminali pluripotenti indotte" (IPS, acronimo derivante dall'inglese "Induced Pluripotent Stem cells").

Le IPS umane possono essere impiegate quali fonti per la produzione indefinita di tutti quei tipi cellulari altrimenti inaccessibili o a limitata sopravvivenza, ad esempio i neuroni. Un recente studio dimostra che le colture derivate da IPS umane sono dei modelli eccellenti, migliori di quanto lo siano i neuroni primari di ratto, per lo studio dello sviluppo neurale, e quindi per il monitoraggio delle alterazioni causate da danni o neurodegenerazione⁸. Con le IPS è possibile ottenere virtualmente tutti i tipi cellulari dallo stesso paziente. Dato che le IPS portano gli stessi geni e mutazioni dei pazienti dai quali provengono, i ricercatori possono utilizzarle per ricreare le malattie in laboratorio e studiare come la genetica di un paziente e le condizioni ambientali contribuiscano alla sua malattia, aprendo le porte ad una nuova era nella medicina personalizzata. Costituiscono la base di partenza per l'allestimento di molti modelli in vitro avanzati, ad esempio gli organoidi. Un organoide è una versione semplificata e miniaturizzata di un organo umano prodotto in vitro in 3 dimensioni (3D) che ne ricapitola l'architettura e la funzione nei suoi tratti salienti. Le cellule staminali, quando sottoposte ad adeguati stimoli biochimici in vitro, si differenziano, si auto-assemblano e si auto-organizzano in tessuti, ricapitolando ciò che accade nell'embrione nelle prime settimane di sviluppo. Gli organoidi possono trovare impiego nella modellizzazione delle patologie umane, nei test di tossicità ed efficacia farmacologica ma si ri-

velano particolarmente utili nello studio del meccanismo regolatorio dell'organogenesi ed effetto di virus, farmaci e xenobiotici sullo sviluppo embrionale^{9,10}. Tra i più importanti limiti degli organoidi vi sono la mancanza di una rete vascolare e della comunicazione con altri tessuti e organi. Questi limiti si stanno già superando con l'implementazione di organoidi assemblati tra loro¹¹, vascolarizzati¹², o connessi in un sistema fluido¹³.

■ Organi e sistemi multi-organo su chip

Gli "Organs-on-Chip" o organi su chip sono sistemi fluidici miniaturizzati per colture cellulari 3D che simulano le attività, la meccanica e la risposta fisiologica di interi organi o sistemi di organi umani. Le colture cellulari 3D (ognuna a rappresentare un tessuto o un organo) interagiscono tra loro su un circuito fluidico che mima la circolazione sanguigna e linfatica. Il sistema permette di mimare le interazioni tra cellule, tessuti ed addirittura organi e sistemi diversi (sistemi multi-organo su chip o human-on-chip), e di fornire gli stimoli meccanici, strutturali e biochimici adeguati, riproducendo a tutti i livelli ciò che avviene in vivo. Grazie ai sensori integrati, è possibile il monitoraggio in tempo reale delle risposte cellulari agli stimoli meccanici o chimici con un controllo più preciso dell'ambiente cellulare rispetto ai metodi convenzionali. L'utilizzo di cellule prelevate dal singolo paziente per l'assemblaggio di humans-on-chip personalizzati rappresenta una delle più grandi promesse per il prossimo futuro della medicina. Molti tessuti ed organi su chip sono già stati sviluppati, sono in continuo perfezionamento e sono applicabili in differenti campi della ricerca, dallo studio delle malattie umane complesse ai test di tossicità.

In un recente studio è stata analizzata la capacità del "fegato su chip" (Figura 2) di prevedere il danno epatico indotto da farmaci, una causa comune di tossicità e fallimento. È emerso che il fegato su chip superava i modelli animali nella capacità di predire il danno epatico. In precedenza, gli stessi farmaci avevano ucciso quasi 250 pazienti e causato 10 trapianti di fegato nonostante avessero superato i test sugli animali. Gli autori concludono affermando che l'adozione su larga scala degli

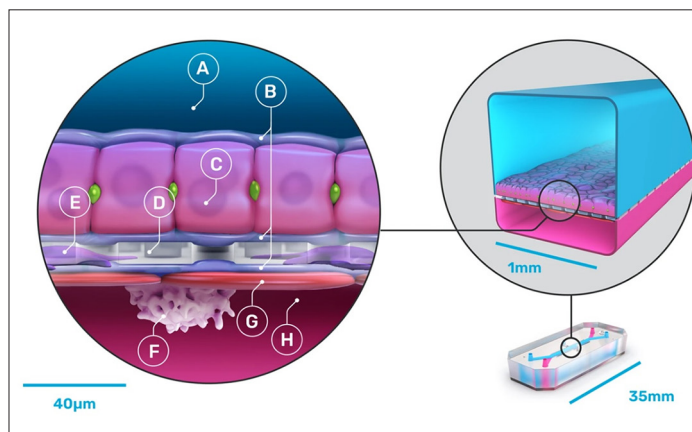


Figura 2. Fegato su chip. Questo diagramma mostra gli epatociti umani primari (C) che sono inseriti all'interno di una matrice extracellulare (B) su una membrana porosa (D) all'interno del canale parenchimale superiore (A), mentre le cellule endoteliali sinusoidali del fegato umano (G), le cellule di Kupffer (F), e le cellule stellate (E) sono coltivate sul lato opposto della membrana nel canale vascolare inferiore (H). Credits: <https://www.nature.com/articles/s43856-022-00209-1#Fig1>

Organs-on-Chip aiuterebbe a ridurre il tasso di fallimento del processo di produzione e sviluppo di nuovi farmaci, minimizzando il rischio di danni ai pazienti¹⁴. Similmente, i vasi sanguigni su chip si sono dimostrati in grado di prevedere gli effetti pro trombotici indotti da farmaci, laddove i modelli tradizionali avevano precedentemente fallito¹⁵.

■ Metodi computazionali

Per “metodo computazionale” si intende la rappresentazione matematica di un processo o sistema semplificato un tentativo di imitare la realtà attraverso una simulazione al computer. I sistemi umani, dai singoli organi a tutto il corpo, possono essere simulati utilizzando programmi informatici altamente sofisticati. Questi vengono creati utilizzando i dati ottenuti dagli studi su soggetti umani. Possono essere utilizzati in modo integrato con i modelli in vitro per l'estrapolazione in vitro – in vivo (modelli farmacocinetici e farmacodinamici) o per simulare, analizzare e predire l'interazione tra le variabili coinvolte nell'efficacia di un trattamento farmacologico. Approcci come la modellazione della relazione quantitativa struttura-attività (QSAR) possono essere applicati per sostituire e ridurre l'uso di animali nei test di sicurezza ed efficacia¹⁶.

---I ricercatori all'Università di Oxford hanno sviluppato delle simulazioni al computer che sono in grado di superare i modelli animali nel predire gli effetti pro aritmici indotti da farmaci¹⁷.

■ Conclusioni

I NAMs, integrati tra loro e con gli studi interventistici ed osservazionali sugli esseri umani (pazienti e sani),

costituiscono degli strumenti di fondamentale importanza per l'avanzamento della ricerca biomedica e tossicologica permettendo la migliore comprensione dei meccanismi alla base della salute e della malattia, migliori strategie preventive, lo sviluppo di farmaci e vaccini più sicuri ed efficaci per la specie umana ed il superamento della sperimentazione animale, che ad oggi solo in Italia sottopone a sofferenza e morte oltre 550 mila animali l'anno (dati Gazzetta Ufficiale n.26 del 01-02-2022 – relativi al 2018).

Bibliografia

1. Marshall LJ, Bailey J, Cassotta M, Herrmann K, Pistollato F. Poor Translatability of Biomedical Research Using Animals - A Narrative Review. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*. 2023;2611929231157756.
2. Hartung T. Look back in anger - what clinical studies tell us about preclinical work. *Altex*. 2013;30(3):275-91.
3. Herrmann K, Pistollato F, Stephens ML. Beyond the 3Rs: Expanding the use of human-relevant replacement methods in biomedical research. *Altex*. 2019;36(3):343-52.
4. Stucki AO, Barton-Maclaren TS, Bhuller Y, Henriquez JE, Henry TR, Hirn C, et al. Use of new approach methodologies (NAMs) to meet regulatory requirements for the assessment of industrial chemicals and pesticides for effects on human health. 2022;4.
5. Stebbings R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve pre-clinical testing of immunotherapeutics. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;179(5):3325-31.
6. Straticell. Straticell 2023 [Available from: <https://straticell.com/>].
7. Epithelix. Epithelix Innovative in Vitro Respiratory Solutions 2023 [Available from: <https://www.epithelix.com/>].
8. Estévez-Priego E, Moreno-Fina M, Monni E, Kokaia Z, Soriano J, Tornero D. Long-term calcium imaging reveals functional development in hiPSC-derived cultures comparable to human but not rat primary cultures. *Stem cell reports*. 2023;18(1):205-19.
9. Qian X, Nguyen HN, Jacob F, Song H, Ming G-L. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly. *Development*. 2017;144(6):952.
10. Forsythe SD, Devarasetty M, Shupe T, Bishop C, Atala A, Soker S, et al. Environmental Toxin Screening Using Human-Derived 3D Bioengineered Liver and Cardiac Organoids. *Frontiers in public health*. 2018;6:103.
11. Kanton S, Paşca SP. Human assembloids. *Development*. 2022;149(20).
12. Salmon I, Grebenyuk S, Abdel Fattah AR, Rustandi G, Pilkington T, Verfaillie C, et al. Engineering neurovascular organoids with 3D printed microfluidic chips. *Lab on a chip*. 2022;22(8):1615-29.
13. Zhu J, Ji L, Chen Y, Li H, Huang M, Dai Z, et al. Organoids and organs-on-chips: insights into predicting the efficacy of systemic treatment in colorectal cancer. *Cell Death Discovery*. 2023;9(1):72.
14. Ewart L, Apostolou A, Briggs SA, Carman CV, Chaff JT, Heng AR, et al. Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology. *Communications Medicine*. 2022;2(1):154.
15. Barrielle R, van der Meer AD, Park H, Fraser JP, Simic D, Teng F, et al. Organ-on-Chip Recapitulates Thrombosis Induced by an anti-CD154 Monoclonal Antibody: Translational Potential of Advanced Microengineered Systems. 2018;104(6):1240-8.
16. Madden JC, Enoch SJ, Paini A, Cronin MTD. A Review of In Silico Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*. 2020;48(4):146-72.
17. Passini E, Britton OJ, Lu HR, Rohrbacher J, Hermans AN, Gallacher DJ, et al. Human In Silico Drug Trials Demonstrate Higher Accuracy than Animal Models in Predicting Clinical Pro-Arrhythmic Cardiotoxicity. 2017;8(668).