

Conferenza  
NAZIONALE  
BENESSERE  
animale

Roma, 13-14-15 Aprile 2016



# METODI ALTERNATIVI: STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE FUTURE

Maura Ferrari

IZSLER - Brescia

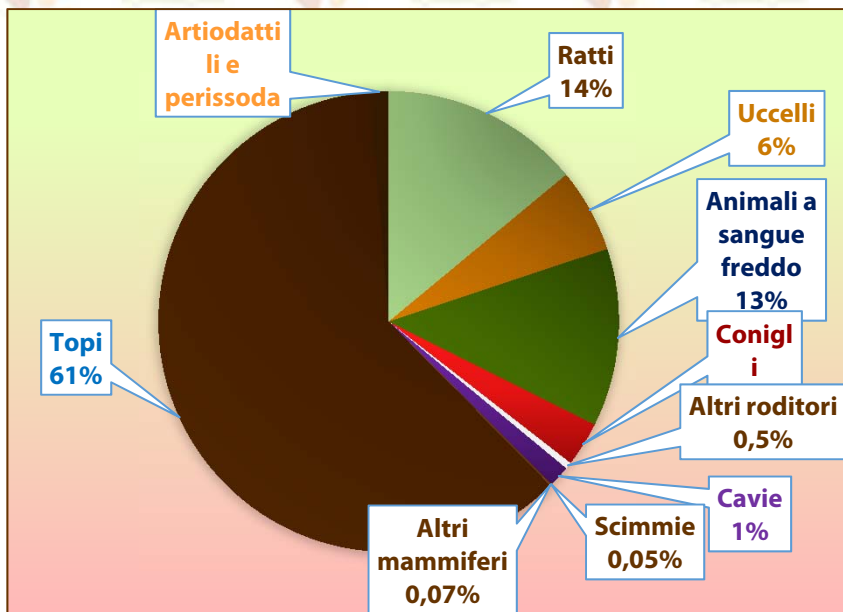


CENTRO DI REFERENZA PER I METODI ALTERNATIVI,  
CURA E BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

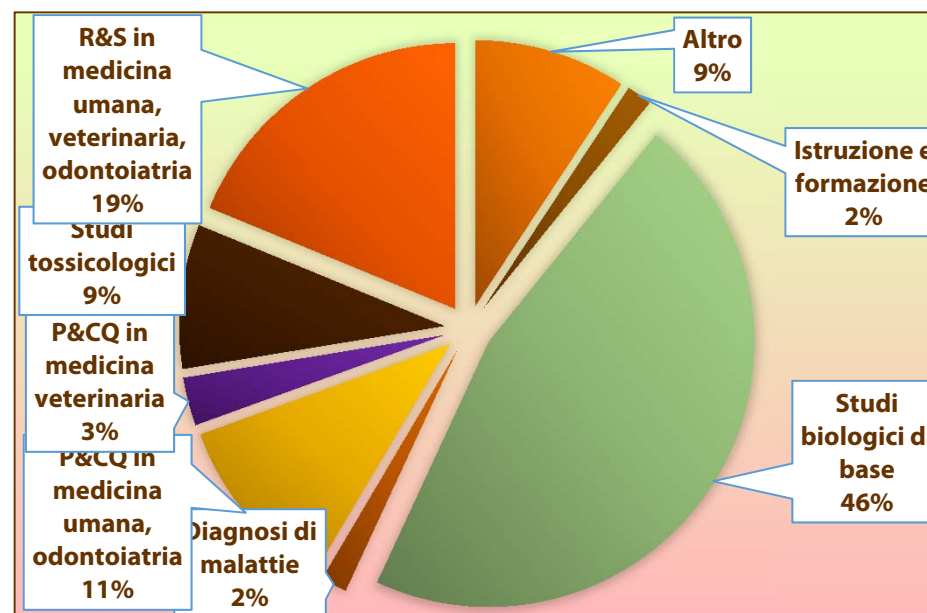
# Generalità

- Sperimentazione animale (diverse specie animali) perseguita da lunghissimo tempo (babilonesi 2000 a.C, IV secolo ,Ippocrate, Grecia)
- Settori applicativi diversificati:
  - Controllo di farmaci e molecole (in precedenza: cosmetici, Regolamento Europeo 1223/2009, applicato da 11 luglio 2013)
  - Indagini tossicologiche
  - Applicazione di nuove procedure mediche e chirurgiche
  - Produzione di vaccini e loro controllo
  - Produzione di anticorpi inclusi i monoclonali
- Linee guida per la gestione degli animali (dall'allevamento, al trasporto e all'impiego sperimentale) (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use -ICH, Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals- CPCSEA, National Institutes of Health - NIH, Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD)
- **Metodi Alternativi**
- Proposti per ridurre le sperimentazioni *in vivo* e limitare gli inconvenienti ad esse associate (costi elevati, tempi di indagine prolungati; talvolta, esiti non trasferibili dalla specie animale a quella ospite)
- Principio delle "3 R"





Commissione Europea (COM 2013, 859 final)





# Reduction

- Aspetto cruciale: accurata valutazione del programma di studio
- Indagini preliminari mediante indagini *in silico*, di tipo statistico, modelli computazionali (riduzione animale anche del 60%)
- Metodi di laboratorio di varia natura utilizzabili come *screening*
  - a) Consistenti in sistemi di saggio automatizzati (accertamento della solubilità di composti e aspetti metabolici)
  - b) Informazioni dettagliate sul metabolismo (citotossicità, mutagenesi e rischi tossicologici)
  - c) Saggi basati su colture cellulari (studi farmacocinetici / tossicologici; caratterizzazione della efficacia e sicurezza di un farmaco/prodotto)
  - d) Reazioni sierologiche per la efficacia di vaccini (ELISA)



# *Refinement*

- Condizioni ambientali degli animali in accordo al principio del Benessere animale
- Condizioni non fisiologiche e stressanti, alterazioni metaboliche degli animali e risultati non sempre riproducibili e standardizzati
- *Refinement* pertanto: necessario anche per le caratteristiche qualitative delle ricerche svolte *in vivo*
- Accurata valutazione della possibile traslazione dei risultati emersi dalla sperimentazione animale all'uomo : possono essere indicativi di innocuità, ma non sempre corrispondenti alla reale efficacia nell'ospite bersaglio
- **Innovazione recente:** inserimento temporaneo, per via orale, di un catetere nello stomaco di cani per la somministrazione di farmaci in esame. Riduzione significativa delle condizioni stressanti, psicologiche e comportamentali miglioramento significativo delle condizioni di benessere degli animali (Hall et al., J. Pharmacol. Toxicol. Meth, 2015, 72: 35-46)



# Replacement

- Realizzabile, ma per attività di tipo regolatorio; tempi prolungati per la loro ufficializzazione (sviluppo, proposta ad EURL-ECVAM; validazione EU-NETVAL, accettazione OECD, ufficializzazione Farmacopea Europea , EMA )
- Attività di laboratorio diversificate:
  - Colture cellulari (cellule pancreatiche per indagini tossicologiche sul pancreas (95% riduzione animali); sviluppo di aorta di ratto *in vitro* per la valutazione di farmaci (90% riduzione animali)
  - Modelli computazionali, indagini *in silico* (*Adsorption / Distribution / Metabolism / Excretion /ADME*)
  - Metodologie innovative incluse quelle di immagine
  - Associazione di dati epidemiologici e clinici
- Contribuiscono all'acquisizione di informazioni utili che permettono velocizzare il percorso delle indagini pre-cliniche verso lo sviluppo clinico



# Stato dell'Arte dei Metodi Alternativi

- Applicazione dei metodi sviluppati dal centro ECVAM in accordo alle linee guida OECD
- Sviluppo di nuovi metodi da utilizzarsi in ambito «regolatorio» e principalmente relativi ad aspetti tossicologici
- Attualmente i metodi riconosciuti sono **No. 50**

di essi:

**No. 19** consentono la «*Reduction/Refinement*» in ambito tossicologico e **No. 11** in altri settori (sostanze endocrine, produzione di biologici e vaccini, pirogenicità ed endotossine batteriche)

**No. 20** consentono il «*Replacement*» solo parzialmente o, in alcuni casi, totalmente

**Metodi alternativi *in vitro/ex vivo*, relativi alla salute umana, validati da EURL-ECVAM e relativi riferimenti normativi (luglio 2015)**

NUMERO DI SAGGI	ENDPOINT	Riferimento OECD
<b>Area di applicazione regolatoria: Replacement o Partial Replacement</b>		
4	Irritazione Cutanea	TG <sup>a</sup> n. 439
6	Corrosione Cutanea	TG n. 430, 431, 435
1	Penetrazione/Absorbimento cutaneo	TG n. 428
5	Irritazione/Corrosione oculare	TG n. 437, 438, 460, 491, 492
4	Genotossicità	TG <u>n.</u> 473, 476, 487, 490
<b>Area di applicazione regolatoria: Reduction/Refinement</b>		
2	Sensibilizzazione Cutanea	TG n. 442 C, D
1	"Starting dose" in Tossicità Acuta <sup>b</sup>	GD <sup>c</sup> n. 129
1	Fototossicità	TG n. 432
1	Trasformazione cellulare (SHE CTA) <sup>d</sup>	GD n. 214
<b>Altro</b>		
3	Sostanze endocrine attive	TG n. 455, 457, 493
3	Prodotti biologici e Vaccini (Stabilità e test di potenza del prodotto)	Farmacopea Europea
5	Pirogenicità da Endotossine di Gram negativi	Farmacopea Europea; General Method 2.6.30

**Metodi alternativi *in vivo*, relativi alla salute umana, validati da EURL-ECVAM e relativi riferimenti normativi (luglio 2015)**

NUMERO DI SAGGI	ENDPOINT	Riferimento OECD
<b>Area di applicazione regolatoria: Reduction/Refinement</b>		
4	Tossicità Acuta (orale, inalatoria)	TG n. 420, 423, 425, 436
1	Irritazione Cutanea	TG n. 404
1	Irritazione Oculare	TG n. 405
3	Sensibilizzazione Cutanea	TG n. 429, 442 A, B
1	Genotossicità	TG n. 489
4	Tossicità Ripetuta/Riproduttiva	TG n. 422, 443, 483, 488

<sup>a</sup>Testing Guideline: descrive le procedure di un metodo sperimentale

<sup>b</sup> Da utilizzare in un approccio del peso dell'evidenza per identificare la dose iniziale in studi di tossicità acuta orale

<sup>c</sup> Guidance Document: fornisce indicazioni su come interpretare i risultati di singoli saggi

<sup>d</sup>Da utilizzare in un approccio del peso dell'evidenza per valutare il potenziale cancerogeno



# Percorso da Attuare

➤ Elevata attenzione alle procedure che permettono di ridurre il numero di animali utilizzati (test *in silico*, valutazioni statistiche, se disponibili, test *in vitro*, simulazioni in modelli computerizzati e basati su specifici software)

➤ Metodi di laboratorio alternativi:

più facilmente realizzabili nel settore diagnostico (es. biotossine algali lipofile, indagini di tipo tossicologico...)

Accertamento innocuità e potenza di prodotti biologici / vaccini

➤ **Modelli *in vivo***: non sostituibili quando **a)** richiesti in ambito regolatorio; **b)** determinazione di parametri di efficacia di farmaci/ prodotti biologici; **c)** determinazioni di aspetti biologici/comportamentali di prodotti/farmaci che richiedono l'ospite vivente nel suo insieme e non riproducibili con sistemi *in vitro*



Utilizzati in accordo al principio del «*Refinement*»



# Modelli *in vivo* alternativi e riconosciuti dalla Direttiva (2010/63/EU)

Se il modello *in vivo* è necessario: verificare il possibile di impiego di organismi alternativi:

- a) *Danio rerio* (zebra fish). Impiego di embrioni e larve facilmente manipolabili (capsule Petri e piastre per colture cellulari). Utilizzabili per indagini tossicologiche di farmaci e composti chimici. Applicazione per studi di patologie diversificate (neurologiche, cardiache, comportamentali e problematiche correlate allo sviluppo di organi)
- b) Modelli invertebrati. Applicati per lo studio di patologie diversificate (dal diabete alla malattia di Parkinson). Breve ciclo di vita, anatomia semplificata e dimensioni ridotte ne consentono l'impiego anche con numerosi soggetti in un singolo esperimento. Esempi : *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*
- c) *Microrganismi. Saccharomyces cerevisiae*. Provvisto di caratteristiche morfologiche e genetiche ben caratterizzate. Di particolare interesse è il suo impiego nella ricerca sul cancro e su aspetti di biologia cellulare di malattie neurodegenerative



# Futuri Orientamenti

- Rispondere alle indicazioni della Direttiva Europea (2010/63/UE), del DL Nazionale (4 marzo 2014 n. 26) e Legge Regione Lombardia (2 marzo 2015 n. 4)
- Proseguire nello sviluppo e standardizzazione di Metodi Alternativi
- Promuovere prove inter-laboratorio
- Allestire un «data base» di metodiche sviluppate, di esperti di riferimento nelle diverse tematiche, di prove già condotte (evitare duplicazioni)
- Depositare campioni di interesse in sedi appropriate a disposizione di altri utenti (biobanche)
- Organizzare corsi teorici/pratici per la diffusione delle metodologie realizzate

## Finalità

- Creare sinergie inter-disciplinari per una migliore e più rapida applicazione del principio delle 3R



# Il Ruolo del Centro di Referenza

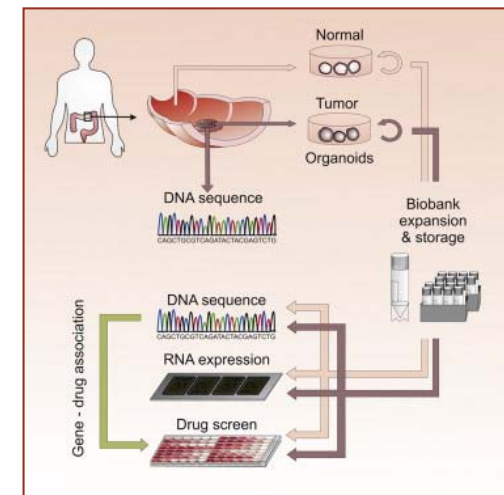
- Promuovere iniziative di aggiornamento; divulgare informazioni e tecnologie innovative
- Incentivare la validazione inter-laboratorio di nuovi Metodi Alternativi per successive proposte al Centro Europeo di Validazione (EU-NETVAL)
- Incentivare l'applicazione di Metodi Alternativi esistenti

Creazione di una rete di laboratori di riferimento pubblici e privati  
per indagini con Metodi Alternativi

Sistema qualità: **basilare** per la standardizzazione e riproducibilità  
di Metodi Alternativi

# Tecnologie Alternative Innovative

- **Modelli 3D di tipo dinamico:** basata sull'allestimento di colture cellulari su scaffolds in grado di garantire un'interazione dinamica tra tessuti che *in vivo* sono interconnessi (es. fegato / pancreas / tessuto adiposo; (studio di farmaci nell'organo bersaglio) (Sbrana *et al.* Sensors and Actuators B: Chemical. 2016. 223:440-446)
- **Organoidi tissutali:** allestiti da CS pluripotenti riprogrammate (IPS) e indotte ad evolvere verso specifici tessuti/organi con formazione strutture in miniatura
- 1) ricostruzione di modelli 3D del cervello embrionale umano da cellule staminali pluripotenti indotte(IPS) (Lancaster *et al.* Nature. 2013. 501: 373-379);
- 2)ricostruzione di un organoide da tumore colon-retto: studio delle mutazioni correlate alla neoplasia e verifica dell'efficacia di chemioterapici. **Metodo alternativo al modello murino.** Biobanca di organoidi tumori colon-rettali isolati da pazienti (van de Wetering *et al.* Cell. 2015. 161: 933-945)



# Tecnologie Alternative Innovative

➤ Identificazione di una sotto-popolazione delle CS cancerogene, ad elevata plasticità, ed elevata resistenza ai chemioterapici (metastasi ricorrenti). Identificazione di *markers* specifici anche in CS cancerogene di pazienti. *Sostituzione del modello murino con tale sotto-popolazione cellulare per lo studio dei meccanismi di resistenza ai chemioterapici* (Biddle *et al.* Biomedicine. 2016. 4: 138-145)

➤ **Organs-on-chips**: basate su chip traslucide in grado di mimare organi umani e che contengono cellule umane. Allestiti per diversi organi (polmone, intestino, reni, cuore ecc.). Consentono di studiare le interazioni dinamiche di nuovi farmaci nei confronti dell'organo

(<http://wyss.harvard.edu/viewpage/484>; <http://harvardmagazine.com/2015/12/mimicking-organs>)



Rappresenta un modello alternativo all'ospite vivente

➤ **Anticorpi sintetici**: Affimeri (reagenti ad elevata affinità ingegnerizzati per legarsi a specifici antigeni. Selezionati da librerie dalle quali si selezionano aminoacidi); Aptameri (oligonucleotidi sintetici a singola elica). Entrambe molecole stabili ad elevata affinità e specificità.

Sostituiscono il modello animale per la preparazione di sieri immuni monospecifici

# Biobanca IZSLER e Rete Nazionale Biobanche veterinarie

- Raccolta e deposito di risorse biologiche diversificate : standard di riferimento ([www.ibvr.org](http://www.ibvr.org))
- Attualmente 20 tipologie di risorse biologiche
- Elevati criteri qualitativi
- Certificazione ISO 9001 2008
- Network nazionale con altri 4 IZS ([www.biowarehouse.net](http://www.biowarehouse.net))
- Riconoscimenti:

Office International des Epizooties (OIE)

(Collaborating Centre, 2014)

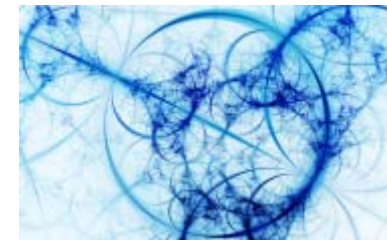
Biobanking and Biomolecular Resources

Research Infrastructure (BBMRI)

(National and European level)

Incrementare il deposito di campioni biologici ottenuti

da sperimentazioni animali





# Osservazioni conclusive

Il principio delle 3 R è un universo finalizzato a tre diversi aspetti

- Sempre maggiore attenzione alle procedure sperimentali condotte in modelli animali e determinazione della rilevanza e trasferibilità degli esiti conseguiti alla specie di interesse
- Sviluppo di metodologie non basate sulla sperimentazione animale : Metodi Alternativi
- Divulgazione delle informazioni associata alla formazione costante

L'associazione delle suddette strategie perseguite nell'ambito di una rete consentirà di poter procedere nel percorso delle 3R riducendo gli sprechi e favorendo le sinergie fra le differenti realtà professionali



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**

