

Sviluppo e applicazione di metodi in vitro e in silico avanzati nella UE

COSTANZA ROVIDA

Toxicologist and Scientific Officer European Centre for Alternatives to Animal Tests (CAAT Europe).

Keywords: sperimentazione; metodi in vitro e in silico.

Abstract

Il lavoro è incentrato sui Nuovi Approcci Metodologici (NAM) in tema di sperimentazione. I problemi da risolvere sono tanti e la tossicologia classica basata sugli animali non fornisce soluzioni.

Per parlare di sviluppo e applicazione di metodo in vitro e in silico avanzati, è doveroso premettere che questi non sono “metodi alternativi”, un concetto sempre di valore ma che è diventato anacronistico. Se si parla di metodi alternativi alla sperimentazione animale, si sottintende che tutto sommato accettiamo i risultati forniti dai test in vivo e che cerchiamo qualcosa di analogo, ma che non sia basato su sperimentazione animale. Ora si tratta di studiare e implementare Nuovi Approcci Metodologici (NAM), intendendo con questo termine un concetto completamente diverso che richiede un cambiamento drastico di mentalità. Con il concetto di NAM si vuole considerare qualunque tecnologia, metodo approccio o loro combinazione e che può essere utilizzata per fornire informazioni circa il reale meccanismo con cui una sostanza chimica può esercitare un effetto tossico sulla salute umana, includendo sistemi in vitro complessi con modelli 3D o di organoidi umani, modellistica al computer e intelligenza artificiale, dati epidemiologici e test su campioni biologici umani oltre eventualmente a metodi basati su organismi non vertebrati, con un approccio integrato IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*). In realtà, non esiste una definizione univoca per i NAM ed esistono diverse versioni per le varie agenzie governative, alcune includendo anche test in vivo. Quello su cui sono tutti concordi è che i NAM rappresentano un modo completamente innovativo di approcciare il problema delle valutazioni tossicologiche, che richiede regole nuove.

I problemi da risolvere sono tanti e la tossicologia classica basata sugli animali non fornisce soluzioni. I test con gli animali durano diversi anni, con una limitata capacità dei laboratori. Considerando il numero di sostanze in circolazione, ci vorrebbe qualche secolo per avere dati su tutte! Senza contare che i risultati ottenuti sugli animali hanno in media poca rilevanza nel descrivere il vero effetto che si può registrare sugli esseri umani. Bisogna anche tenere conto che non esistono sostanze completamente non tossiche, e tutti gli effetti sono gradualmente con possibili reazioni diverse tra gli individui.

Il ruolo dei NAM nella tossicologia sta diventando sempre più importante, con diversi programmi volti al loro sviluppo e recepimento. Per esempio, il cluster ASPIS

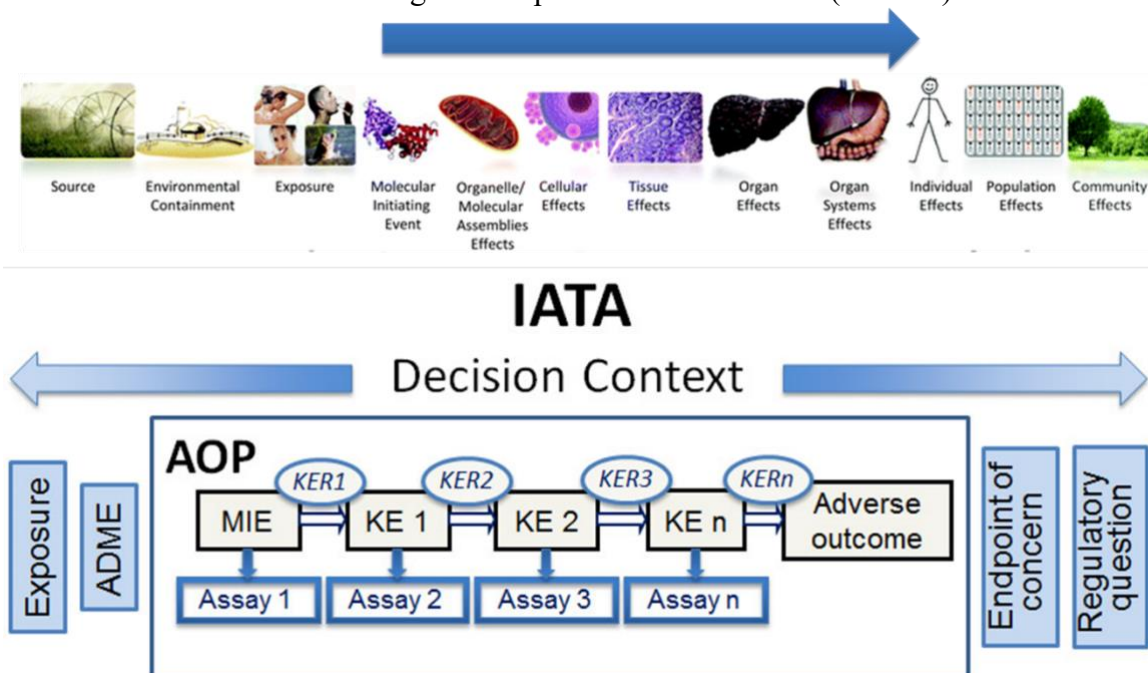
(<https://aspis-cluster.eu/>) è stato finanziato con 60 milioni di euro e coinvolge circa 70 partecipanti sparsi in tutta Europa e non solo divisi in tre progetti: RiskHunt3R, PrecisionTox e OnTox. Gli obiettivi sono:

- sviluppare NAMs per la protezione della salute umana e dell'ambiente
- Migliorare l'accuratezza della valutazione della sicurezza delle sostanze
- Facilitare l'applicazione pratica di soluzioni senza animali sia nel pubblico (es. Agenzie regolatorie) che nel privato (industria)
- Trasportare risultati metodi e soluzioni dalla ricerca scientifica alla pratica comune
- Promuovere l'applicazione in ambito regolatorio e lo sfruttamento commerciale dei NAMs
- Contribuire ai principi delle 3R

Un'altra iniziativa di rilievo è costituita dal progetto PARC (Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals) che ha lo scopo di sviluppare un approccio per Next Generation Risk Assessment (NGRA) per la salute umana e per l'ambiente. E' una partecipazione pubblica e nasce dall'esigenza di dare delle risposte relative al programma di Chemical Sustainability e all'ambizione di inquinamento zero dettata all'interno della European Green Deal.

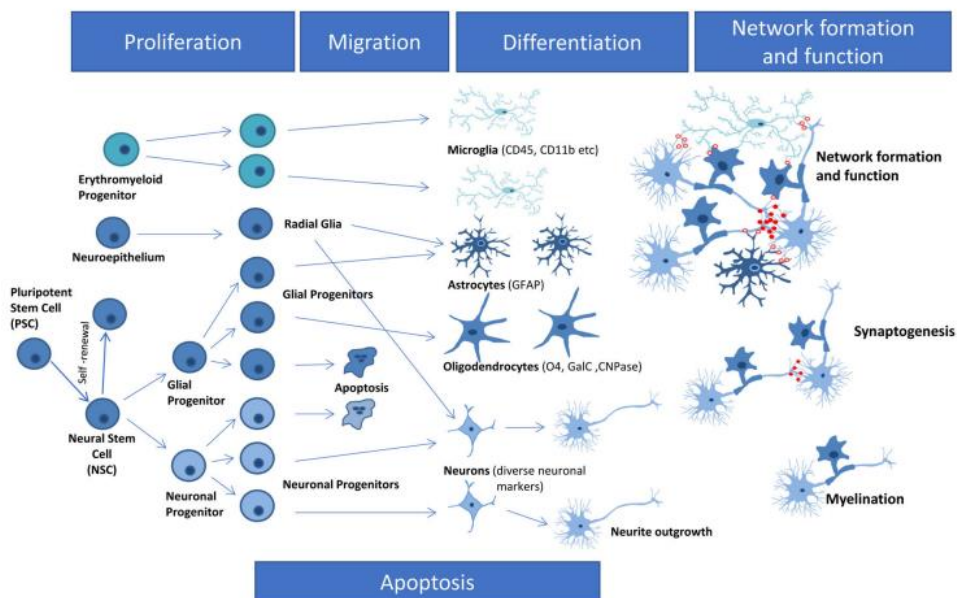
La rivoluzione dei NAM è stata possibile grazie a tecnologie e mezzi che anche solo fino a dieci anni fa non erano disponibili. La grossa innovazione è costituita dalla scoperta di come fare a derivare cellule staminali pluripotenti (iPSC, induce pluripotent stem cells) partendo da cellule adulte. Questo permette di ricreare in laboratorio tutte le cellule e i tessuti che costituiscono il corpo umano, generando materiale utile per fare test tossicologici. La tecnologia è in realtà molto complessa, ma la ricerca procede velocemente e sono già oggi disponibili vari organoidi che mimano in modo sorprendente la situazione di un vero organismo.

In generale, il principio che si vuole perseguire è quello di focalizzarsi sulla sequenza di eventi che avvengono nell'organismo quando entra in contatto con una sostanza esogena, che sia un inquinante, un farmaco o altro. Il concetto è quello per cui, l'azione di una sostanza che entra in un organismo parta dall'interazione (chimica) con un



determinato recettore di una cellula. Questa provoca un'azione a livello cellulare, che si ripercuote sul tessuto di cui quella cellula è parte, poi sull'organo e sull'organismo, fino a trasformarsi in un eventuale effetto avverso. L'idea è quella di sviluppare metodi in vitro che rappresentino tutti questi passaggi, per definire un modello basato sul meccanismo di azione che porti a un effetto avverso quando un organismo entra in contatto con una sostanza esogena. Così è stato costruito il concetto degli "Adverse Outcome Pathways" (AOPs) che rappresentano una struttura per organizzare le informazioni ottenute da opportuni test in vitro. In realtà, gli AOP sono molto complessi perché spesso la sequenza non è lineare, quindi un effetto su una cellula può avere ripercussioni su organi diversi e molti eventi scatenano una cascata di effetti su più fronti, senza contare i casi in cui sia necessario un'azione ripetuta per registrare conseguenze e la singola interazione è insignificante. Ciononostante, gli AOP si sono rivelati un sistema efficace per strutturare i dati che si raccolgono con test in vitro.

Un esempio interessante è rappresentato dai passaggi che sono necessari per lo sviluppo del sistema neurale nell'embrione durante lo sviluppo. Va subito sottolineato che questo settore è particolarmente rilevante date le differenze sostanziali che esistono tra il cervello di un essere umano e quello di un ratto, evidenziando i grossi limiti che si possono avere considerando i test effettuati su animali utili ed efficaci per predire la tossicità per le persone. Partendo da cellule staminali umani riprogrammate (Induced pluripotent stem cells, iPSC) è possibile ricreare un minicervello (minibrain) in 3D, simulando le varie fasi che avvengono durante le prime fasi di sviluppo dell'embrione e cioè proliferazione, migrazione, differenziazione a formazione dei network neuronali in aggiunta a sistemi di tossicità generici che possono portare ad apoptosi delle cellule.



Questo modello si sta rivelando molto utile sia per studiare l'effetto di sostanze tossiche sullo sviluppo neuronale ma anche malattie congenite come autismo e sindrome di Down¹.

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6545888/pdf/nihms-1527783.pdf>

I modelli di minibrain stanno avendo uno sviluppo interessante visto che studi recenti hanno dimostrato la loro capacità di avere attività neuronale, come se quasi “pensassero” autonomamente, con possibili applicazioni per creare una sorta di computer biologici. Si aprono quindi nuovi scenari con risvolti etici da considerare, prima di iniziare un qualunque progetto scientifico.

Anche l'intelligenza artificiale ha un ruolo chiave, con la necessità di rielaborare le informazioni esistenti, combinare i dati acquisiti con un approccio biostatistico robusto e anche per la valutazione dell'esposizione in correlazione alla quantità di sostanza che può raggiungere il sito dove una eventuale effetto tossico può essere esercitato.

Il mondo dei NAMs è un settore in espansione che offre molte potenzialità. Sono in molti a credere che la strada è ormai tracciata e che le nuove tecnologie soppianderanno completamente l'uso di animali per adottare strategie più efficaci e molto più predittive per determinare gli effetti derivanti da esposizione di sostanze chimiche.