

Strategie di Test Integrate (ITS) per la valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche

Monica Locatelli, Costanza Rovida
REACH Mastery, Como

Premessa

A livello mondiale esistono molti progetti in corso che sono focalizzati sulla possibilità di sostituire i test sugli animali con una combinazione di approcci *in vitro* e *in silico* (Basketter *et al.*, 2012, Hartung *et al.*, 2013a). Dal punto di vista regolatorio, il primo Regolamento che ha ammesso in modo esplicito l'uso di strategie ITS è stato il regolamento europeo sulla valutazione delle sostanze chimiche e del rischio collegato al loro utilizzo (REACH, Regolamento CE 1907/2006). Questo regolamento rappresenta una rivoluzione in ambito

legislativo per molti aspetti, compreso quello per cui il concetto di strategie ITS è stato per la prima volta incluso in un testo di legge con alcune spiegazioni su come poterlo applicare.

Al REACH si aggiunge nella UE il regolamento sui cosmetici (Regolamento CE 1223/2008) che conferma il divieto di testare sugli animali qualunque ingrediente utilizzato per scopi cosmetici.

Questo divieto ha portato ad una serie di iniziative tra cui il gruppo di progetti denominato SEURAT-1 (www.seurat-1.eu), co-finanziato dall'associazione di settore *Cosmetics Europe*, insieme alla Commissione Europea, per cui si cercano di studiare strategie ITS per la valutazione della tossicità a dosi ripetute. Questi progetti comprendono la creazione di organi virtuali con modelli 3D di cellule umane unite a simulazioni al computer per lo studio della reattività delle sostanze chimiche e per approcci di tipo statistico.

Un approccio quantitativo basato sul peso dell'evidenza (*Weight of Evidence* - WoE, Balls *et al.*, 2006) è stato elaborato per mezzo del progetto OSIRIS (<http://www.ufz.de/osiris>) con l'applicazione di strategie ITS per la sensibilizzazione cutanea, la mutagenicità e la cancerogenicità utilizzando reti bayesiane (Buist *et al.*, 2013, Rorije *et al.*, 2013), tenendo presente che queste ultime sono solo una delle diverse possibilità esistenti per la gestione di informazioni ridondanti e contrastanti.

Negli Stati Uniti, nel 2007 è stato pubblicato un libro (NRC, 2007: *Toxicology in the 21st Century*) in cui si ribadisce il concetto per cui gli approcci tradizionali basati sui metodi *in vivo* sono troppo dispendiosi in termini di tempo e risorse economiche, richiedono il sacrificio di molti animali e, peggio ancora, gran parte degli studi sugli animali potrebbero non essere rilevanti per stabilire cosa succede veramente negli esseri umani. In conseguenza a questo, è stato avviato

Indice:

Strategie di Test Integrate (ITS) per la valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche
Monica Locatelli, Costanza Rovida..... pag. 1

Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) - sviluppi e limiti
Emilio Benfenati..... pag. 4

Tossicologia *in silico*: una sfida che non possiamo perdere
Ivano Eberini..... pag. 6

Zebrafish: modello sperimentale alternativo nella ricerca biomedica
Michele Navarra, Antonino Germanà..... pag. 7

Test *in vivo* di tossicologia: uso del minipig per coniugare le richieste 3R con la necessità di dati affidabili su modelli animali "non-rodent"
Isabella Andreini..... pag. 10

il programma di ricerca ToxCast e Tox21 della EPA (*Environmental Protection Agency*) per testare migliaia di sostanze chimiche con un'ampia gamma di modelli cellulari su ognuno dei quali si vanno a misurare diversi marker biologici. L'idea è quella di acquisire un gran numero di informazioni che opportunamente valutate possano contribuire alla definizione della tossicità in tempi molto più brevi e in modo più predittivo rispetto l'approccio classico.

Anche il programma di lavoro dell'OECD (OECD, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; in italiano OCSE, Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) è rilevante in questo contesto. La serie sulla Sperimentazione e la Valutazione dell'OECD N° 168 (OECD N° 168, 2012 a-b) è particolarmente interessante dal momento che illustra la possibilità di affrontare la valutazione di un *endpoint* applicando il concetto dell'*Adverse Outcome Pathways* (AOP, vie per effetti avversi), che rappresenta quanto attualmente conosciuto riguardo al collegamento tra un evento scatenante a livello molecolare ed un esito sfavorevole a livello individuale o di popolazione (Ankley *et al.*, 2010). L'OECD è anche responsabile del cosiddetto QSAR *Tool Box* (www.qsartoolbox.org), un software disponibile gratuitamente che aiuta chi ha il compito di valutare i rischi nell'individuazione di rischi strutturali e nella definizione di gruppi e caratteristiche simili tra le sostanze chimiche.

Composizione delle strategie ITS

Il Regolamento REACH prevede la possibilità di evitare di testare ogni sostanza per ogni *endpoint* e raccomanda in molti punti di evitare il più possibile la sperimentazione animale ingiustificata, utilizzando metodi alternativi come il raggruppamento delle sostanze in categorie, il *read across*, metodi *in vitro* e metodi *in silico* (QSAR). Sarebbe stato impensabile richiedere tests su tutte le sostanze prodotte o importate in Europa, sia per ragioni di tempo, sia economiche, sia perché essendo ancora l'animale la fonte

principale di informazioni sulla tossicologia delle sostanze chimiche, si avrebbe anche un ingiustificato dispendio di vite. In numerose parti del regolamento sono descritti sia i principi, che le metodologie consigliate. I criteri sono descritti nell'allegato XI (Norme generali per l'adattamento del regime normale di test di cui all'allegato VII e X) e spiegate nella "Guida ai requisiti informativi e valutazione della sicurezza chimica Capitolo R6: QSAR e raggruppamento delle sostanze chimiche" e "Guida pratica 6: come segnalare *read-across* e categorie".

In breve le guide illustrano gli elementi necessari per poter utilizzare dati sulle sostanze simili in un approccio integrato che ne supporti la robustezza e ne diminuisca l'incertezza perché è possibile che ognuno di questi metodi da solo non sia sufficiente a dimostrare la solidità della deduzione, ma se utilizzati in un contesto di "peso dell'evidenza" dove diverse informazioni da diverse fonti conducono alle stesse conclusioni in maniera consistente allora si può concludere che il risultato sia affidabile.

Quando si parla di sostanze simili, esse possono essere considerate tali sotto diversi punti di vista; si può infatti parlare di somiglianza strutturale o di somiglianza meccanicistica e non sempre le due similarità combaciano. Piccole variazioni strutturali infatti possono determinare per alcuni *endpoint* enormi differenze di comportamento, così come stessi meccanismi possono essere innescati da strutture apparentemente diverse.

Da queste potenziali differenze, determinate dalla complessità dei meccanismi biologici nella esplicazione dell'effetto tossico, deriva la necessità di affrontare ogni incognita da più punti di vista e con metodologie uniformi e riconosciute.

Generalmente il termine "ITS" viene usato quando più esperimenti vengono condotti congiuntamente per stabilire gli effetti tossicologici di una sostanza e dovrebbero essere composte da elementi fondamentali con punti decisionali precisi che permettano di interrompere il processo quando si raggiunge un livello di certezza pre-definito, e ottimizzare di conseguenza il numero

di esperimenti necessari. L'approccio fondato sul WoE è di solito basato sui dati esistenti, mentre le strategie ITS dovrebbero considerare in prospettiva quali analisi è necessario effettuare per la valutazione di un *endpoint* particolare. Le strategie ITS includono anche metodi computerizzati (*in silico* e comparativi come "read-across") e possono considerare ogni tipo di dato sperimentale esistente.

Tutti i risultati disponibili dovrebbero avere una precisione nota e quantificabile, in modo da permettere l'applicazione di un approccio probabilistico oggettivo. Uno strumento di modellizzazione ampiamente utilizzato e ben sviluppato è dato dalle reti baiesiane (*Bayesian Networks* - BN), il cui potenziale nell'ambito delle strategie ITS è stato introdotto da Jaworska e Hoffmann (2010), sebbene anche altre tecniche risultino praticabili (Jaworska *et al.*, 2013).

Qualsiasi strategia ITS dovrebbe essere studiata per soddisfare uno scopo specifico, mantenendo un giusto equilibrio tra ambito di applicazione, informazioni sufficienti, costo e fattibilità sperimentale della sperimentazione (Natsch, 2014). L'interruzione di una sequenza di test nell'ambito di una strategia ITS dipende molto dal livello di conoscenza che si desidera raggiungere e quindi dallo scopo per cui si sta eseguendo la valutazione tossicologica.

Ogni prova che contribuisca ad elaborare le strategie ITS deve essere ben descritta, sia essa basata sulla comprensione biochimica del meccanismo di azione (*Mechanism of Action* - MoA), sugli effetti cellulari, o collegata ad altri aspetti che, per esempio, potrebbero influenzare la biodisponibilità della sostanza. Le definizioni dei metodi di prova dovrebbero comprendere un protocollo definito, il tipo di *endpoint* raggiunto, l'ambito di applicabilità e la precisione della misura.

Una strategia ITS innovativa dovrebbe essere flessibile e preferibilmente basata su un approccio probabilistico. I metodi dovrebbero essere selezionati in modo da assicurare il miglior equilibrio tra numero delle prove (cioè sforzo, tempo e risorse) e informazioni ottenute. Anche le considerazioni economiche potrebbero essere rilevanti, dal momento che i metodi più complessi di solito

sono anche più costosi perché richiedono apparecchiature sofisticate ed esperienza tecnica.

Le strategie ITS devono essere aperte, autorizzando così l'omissione o l'aggiunta di nuove prove man mano che diventano disponibili, o quando nozioni recentemente acquisite permettono di ottenere una combinazione più efficace. Le motivazioni alla base di ogni scelta devono essere trasparenti e oggettive, e indipendenti dal giudizio personale degli operatori, a qualsiasi livello.

Gli strumenti statistici usati per interpretare i risultati ottenuti con le strategie ITS devono essere imparziali e in grado di valutare quando la conoscenza acquisita abbia raggiunto un livello di certezza sufficiente per raggiungere l'obiettivo finale, ed interrompere così il processo.

Bibliografia

Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., et al. (2010). *Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (3), 730-741.

Balls, M., Amcoff, P., Bremer, S., et al. (2006). *The Principles of Weight of Evidence Validation of Test Methods and Testing Strategies. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 58*. *ATLA* 34, 603-620.

Basketter, D. A., Crozier, J., Hubesch, B., et al. (2012). *Optimised testing strategies for skin sensitization--the LLNA and beyond*. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 64 (1), 9-16.

Buist, H., Aldenberg, T., Batke, M., et al. (2013). *The OSIRIS Weight of Evidence approach: ITS mutagenicity and ITS carcinogenicity*. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 67 (2), 170-181.

Hartung, T., Luechtefeld, T., Maertens, A. and Kleensang, A. (2013a). *Food for Thought... Integrated Testing Strategies for Safety Assessments*. *ALTEX* 30 (1), 3-18.

Jaworska, J. and Hoffmann, S. (2010). *Integrated Testing Strategy (ITS) - Opportunities to Better Use Existing Data and Guide Future Testing in Toxicology*. *ALTEX* 27 (4), 231-242.

Jaworska, J., Dancik, Y., Kern, et al. (2013). *Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitisation potency: from theory to practice*. *J. Appl. Toxicol.* 33 (11), 1353-1364.

Natsch, A. (2010). *The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers--functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers*. *Toxicol. Sci.* 113 (2), 284-292.

NRC, National Research Council, Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents (2007).

Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. Washington, DC, USA: The National Academies Press.

OECD No 168 (2012a). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No.168. ENV/JM/MONO(2012)10/PART1.

OECD No 168 (2012b). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches. Series on Testing and Assessment No.168. ENV/JM/MONO(2012)10/PART2.

Rorije, E., Aldenberg, T., Buist, H., et al. (2013). The OSIRIS Weight of Evidence approach: ITS for skin sensitisation. Regul Toxicol Pharm 67 (2), 146-156.

Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) - sviluppi e limiti

Emilio Benfenati

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano

Per valutare le proprietà delle sostanze chimiche vi sono sempre più studi e iniziative che si prefiggono di evitare l'uso degli esperimenti di laboratorio (*in vivo* o *in vitro*), impiegando invece metodi definiti di non-testing, in cui si ricorre essenzialmente ai cosiddetti metodi *in silico* e al *read across*. Queste prospettive risponderebbero ad alcune sollecitazioni del legislatore, che nel caso della normativa per i cosmetici ha vietato l'uso dei metodi *in vivo*, e nel caso delle sostanze industriali ha contemplato la possibilità di usare tali metodi, se si soddisfano i requisiti listati nell'allegato XI.

Per metodi *in silico* si intendono una numerosa famiglia di metodi in cui le proprietà tossicologiche, ecotossicologiche, ambientali, ma anche altre, sono stimate sulla base della struttura chimica. Tali metodi sono più o meno sofisticati, e in alcuni casi utilizzano anche informazioni sui recettori, ma nel caso delle proprietà tossicologiche ed ecotossicologiche tipiche questa informazione non è impiegata. Si parla anche di metodi QSAR, ovvero "*quantitative structure-activity relationship*".

Tali metodi usano la struttura chimica come elemento di valutazione ed una serie di parametri ad essa associata. Il software

esegue la predizione basandosi unicamente su tali informazioni, associate con le proprietà sperimentali di una serie, preferibilmente ampia, di sostanze chimiche di riferimento. Vi sono molti modelli QSAR. Alcuni si basano sul riconoscimento di alcuni frammenti strutturali associati all'effetto: ad esempio, se ho un gruppo nitro aromatico allora la molecola è genotossica. Altri modelli usano invece dei descrittori molecolari, quali il peso molecolare, il volume molecolare, parametri quantomeccanici, etc. Vi sono migliaia di tali descrittori. Altri modelli *in silico* confrontano le strutture dei composti simili e assegnano il valore della proprietà del composto incognito mediando i valori delle sostanze chimiche. Questi ultimi modelli sono una sorta di *read across* automatico.

Il *read across* è un'altra procedura nella famiglia dei metodi di non-testing. Il *read across* è tipicamente condotto dall'esperto il quale valuta una o più molecole simili e poi stima il valore della proprietà della molecola in esame. Il metodo *read across* è molto flessibile, poiché si può applicare a ogni proprietà senza costruire alcun modello. Tuttavia, spesso è stato criticato per essere soggettivo. Infatti, l'esperto si basa sulla propria esperienza, ha una base di partenza differente dai colleghi, la definizione di similarità non è univoca e a volte si sono avuti risultati contrastanti anche valutando lo stesso studio di riferimento.

Esistono molti software per eseguire i modelli QSAR ed anche alcuni per il *read across*.

Vi sono sia modelli commerciali che modelli gratuiti. Nella nostra esperienza, e anche sulla base di confronti fra diversi modelli (si veda ad esempio il report del progetto CALEIDOS: <http://www.caleidos-life.eu/>), non si può affermare che i modelli commerciali sono migliori. Un elenco dei diversi modelli per le diverse proprietà è disponibile sul sito del progetto ANTARES (<http://www.antares-life.eu/>).

Con il passare degli anni i programmi si sono evoluti. Oggi ne esistono di molto sofisticati, che forniscono non solo la predizione, ma anche una valutazione del risultato. Quindi, con certi programmi, l'utente ottiene non solo il valore predetto, ma anche una stima dell'affidabilità. Questa informazione è molto

utile ed è anche richiesta dalla legislazione, ad esempio dal REACH, nell'allegato XI, dove si parla del cosiddetto "campo di applicazione". Infatti, non si deve pensare che un modello sia valido sempre, per tutte le sostanze. Invece, capita che per una certa sostanza sia preferibile un modello, mentre per una sostanza diversa i risultati di un altro modello siano migliori. Lavorando su raccolte di dati estesi, il progetto CALEIDOS ha confrontato diversi modelli, per cui si possono trarre delle lezioni generali, sulla preferibilità di un modello o di un altro: resta però il punto che i risultati variano a seconda della sostanza, e che conviene applicare più di un modello per predire la stessa proprietà. Una volta ottenute le diverse predizioni, si dovranno poi valutare le predizioni singole e poi giungere a una valutazione complessiva, che tenga conto di tutti gli elementi. Questo è forse il limite principale dei metodi QSAR. Per affrontare questo limite i programmi più sofisticati offrono delle procedure di autovalutazione, per guidare l'utente nella valutazione dell'attendibilità. Gli elementi principali su cui basare il proprio giudizio sono i seguenti:

1. la presenza di composti sufficientemente simili nel training set (la similarità è talvolta misurata in modo quantitativo dal software e questo può aiutare);
2. il fatto che tali composti simili abbiano dei valori della proprietà analoghi;
3. se il modello predica correttamente i composti simili;
4. se i descrittori della sostanza target siano nel range dei valori dei descrittori del set di composti di training;
5. se vi siano dei frammenti associati alla proprietà in comune fra il composto target e le molecole simili;
6. se vi siano frammenti inusuali.

Tali elementi sono stati ripresi in riferimento al software VEGA, che è fra quelli che più ha curato l'aspetto della attendibilità del risultato predetto. Tale software è scaricabile gratuitamente dal sito: <http://www.vega-qsar.eu/>, ed attualmente è uno dei più utilizzati, con migliaia di utenti al mondo. Gli elementi sopra elencati consentono di verificare se il software opera congruentemente con una

serie di verifiche che si possono eseguire, prendendo in considerazione i dati noti, tramite l'indagine delle molecole usate per costruire il modello. Tali elementi devono essere esaminati con attenzione dall'utente, per evitare errori di valutazione.

Quindi, oltre al modello predittivo, VEGA offre una serie di indicazioni indipendenti, che in parte si avvicinano al *read across*, poiché sono mostrati i composti simili. Ad esempio, se ho la predizione che indica tossicità, ma i simili in disaccordo, questo è un chiaro elemento che nel caso specifico il modello è troppo cautelativo. Ma VEGA consente di andare oltre. Infatti, VEGA consente di valutare la consistenza fra le presunte cause di effetto del composto target e del simile. I frammenti associabili all'effetto, quali la presenza di un gruppo epossidico collegabile con la genotossicità, sono indicati da VEGA. Quindi l'utente è informato sulla presenza di tale gruppo nel composto target. L'utente deve valutare se i composti simili contengono tale gruppo, perché questo è un elemento ulteriore per valutare se vi è congruenza fra la predizione e l'attività tossica. Ad esempio, potrebbero esserci dei composti simili non genotossici, ma senza il gruppo epossidico; quindi, l'utente potrebbe non prendere in considerazione i composti simili discordanti, e basarsi più sulla presenza dell'eossido. Ovvero, potrebbero esserci composti simili genotossici, ma senza il gruppo epossidico. Anche in questo caso la rilevanza dei composti simili è inficiata dalla mancanza dello stesso gruppo associato all'effetto.

Fra i programmi per il *read across*, segnaliamo ToxRead: <http://www.toxread.eu/>. Tale software, sviluppato all'interno del progetto CE PROSIL (<http://www.life-prosil.eu/>), è stato valutato molto più riproducibile rispetto ad altri software, in seguito a un questionario con centinaia di risposte da utenti.

Esistono altri programmi con modelli QSAR e per *read across* e noi abitualmente ne usiamo più di uno, e raccomandiamo di fare altrettanto. L'*Environmental Protection Agency* statunitense da decenni lavora nel settore e ha sviluppato diversi modelli, nelle piattaforme EPISuite e TEST. EPISuite, purtroppo, non consente di verificare automaticamente se il composto target è

all'interno del campo di applicazione e l'utente deve verificarlo manualmente secondo le loro indicazioni fornite, mentre TEST lo verifica automaticamente (ma senza una verifica di tutti i parametri sopra indicati). Toxtree è un'altra piattaforma gratuita, sviluppata dal Centro Comune di Ricerca di Ispra, che offre molti modelli. Purtroppo anche Toxtree non offre alcuno strumento per vedere i composti simili e valutare se la sostanza target è nel campo di applicazione.

Tossicologia *in silico*: una sfida che non possiamo perdere

Ivano Eberini

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

La crescita esponenziale della potenza di calcolo degli ultimi anni ha messo a disposizione della comunità scientifica strumenti che erano inimmaginabili fino a pochi anni fa. L'uso del calcolatore e della modellistica nella ricerca biomedica ha rivoluzionato il paradigma della scoperta scientifica in campo farmaco-tossicologico, indirizzando la ricerca sperimentale e relegando la scoperta casuale ad un'area minima del terreno su cui avviene l'innovazione.

La potenza di calcolo e i metodi di biologia computazionale e di bioinformatica strutturale ci consentono di mettere a punto strategie per manipolare le strutture dei bersagli rilevanti nelle patologie e, nel caso in cui non siano note sperimentalmente, per costruire *in silico* i modelli di questi bersagli. La conoscenza della struttura e della dinamica molecolare delle proteine ci permette di prevederne le funzioni, ci fornisce gli strumenti per sviluppare nuovi farmaci in maniera razionale e per predire l'effetto di xenobiotici e sostanze tossiche dal punto di vista del meccanismo di azione, basato proprio sul riconoscimento molecolare.

L'ancora scarsa diffusione dei metodi *in silico*, a causa dell'alta specializzazione richiesta, ha fatto in modo che la percezione delle potenzialità e dei limiti degli approcci

computazionali fosse approssimativa e poco accurata, anche tra gli scienziati che si occupano di ricerca biomedica in laboratorio. Infatti, mentre alcuni ne trascurano completamente il potenziale innovativo, altri ne esaltano limiti di applicabilità ed estensibilità, pensando che si possa trattare dal punto di vista modellistico qualunque problema biologico o quasi.

In questi ultimi anni, l'opinione pubblica ha ricevuto informazioni parziali in merito alla ricerca computazionale, presentata spesso come un'alternativa alla ricerca di laboratorio e clinica. I principali errori di comunicazione che si sono fatti hanno contribuito a diffondere due punti di vista, entrambi inaccurati e in forte antitesi, a proposito della ricerca basata su metodi computazionali. È sbagliato pensare che i metodi *in silico* siano così avanzati da permetterci di simulare *in toto* ciò che accade nell'interazione tra essere vivente e xenobiotici. Al momento, questa possibilità non è realistica, a causa dell'enorme complessità e variabilità, anche individuale, degli organismi nei quali il bersaglio molecolare dello xenobiotico in studio si trova. Ci basti pensare alla scala dimensionale lungo la quale spaziano questi studi, che copre 10 ordini di grandezza in termini di dimensione lineare: dalla lunghezza di un legame covalente (10^{-10} metri) fino alla dimensione dell'organismo (altezza) su cui vengono misurati gli effetti (10^0 metri). Soltanto in casi speciali e soltanto per alcuni aspetti si può predire ciò che accade quando un organismo incontra uno xenobiotico, mentre per la maggioranza dei casi abbiamo la necessità di raccogliere dati sperimentali/osservazionali, che non è facile trasferire ad altri composti. D'altra parte, è sbagliato anche considerare i metodi computazionali come approccio a sé stante, basato su "algoritmi fantascientifici", del tutto inutili a simulare le bio-molecole e incapace di fornire risultati affidabili che possano ridurre significativamente il costo della ricerca, i tempi della scoperta e il tanto deprecato uso degli animali da laboratorio.

Nessuno di questi due punti di vista è realistico. I metodi *in silico* ci stanno mostrando il proprio potenziale di complementarità ai metodi tradizionali della

ricerca scientifica, i propri limiti e la lunga strada che ancora dobbiamo percorrere. Non è più nemmeno pensabile che una ricerca, volta ad esempio a scoprire nuovi farmaci, si basi esclusivamente su prove di laboratorio, nella speranza di ottenere molecole potenti e selettive in tempi e con costi ragionevoli. Ogni progetto di ricerca biomedica applicata aggiornato si deve servire anche di metodi computazionali. La farmacologia e la tossicologia debbono passare dalla conoscenza molecolare della struttura dei bersagli, che può essere guidata dagli studi e dalla progettazione *in silico* di molecole potenzialmente bio-attive, che verranno validate attraverso esperimenti di laboratorio. Il lavoro computazionale non finisce qui; nel caso in cui le molecole si dimostrino attive in laboratorio, i risultati verranno rianalizzati *in silico*, alla ricerca di modelli tossicoforici più generali o nel tentativo di ottimizzare la relazione struttura-attività delle molecole in studio, in funzione degli obiettivi della ricerca. Questo circolo virtuoso non fornisce soltanto dettagli molecolari dell'attività dei composti chimici, ma permette di minimizzare significativamente i costi dei progetti e l'impiego di animali di laboratorio. La tossicologia applica da tempo metodi basati sulla relazione quantitativa struttura attività e di *read across* per cercare di predire gli effetti delle sostanze tossiche sull'uomo e sull'ambiente. Accanto a questi metodi è necessario iniziare a considerare gli effetti tossici delle sostanze chimiche come eventi scatenati da specifici meccanismi di riconoscimento molecolare tra xenobiotico e bersaglio. La conoscenza strutturale di questi bersagli e la simulazione dei meccanismi di interazione *in silico* suggeriscono ai tossicologi che questi metodi possono diventare uno strumento indispensabile, da affinare sempre di più, allo scopo di ridurre l'incertezza derivante dalla mancanza del dato scientifico ottenuto *in vivo*, nelle attività di valutazione del rischio di singoli composti e di miscele di questi. I metodi *in silico*, che non richiedono l'impiego di animali da esperimento, caratterizzati da una maggior processività e più economici di quelli di laboratorio, non possono essere l'unico approccio alla ricerca farmaco-tossicologica,

ma si configurano come il primo passo verso lo sviluppo di una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari alla base di effetti biologici, farmacologici, avversi o tossici, in un continuo scambio e complementazione tra lavoro computazionale e sperimentale. L'Unione Europea sta investendo anche sui metodi computazionali, considerando rilevante questa attività di ricerca in diversi bandi del proprio programma di ricerca e innovazione "Horizon 2020". Sono convinto che questa sia una grande occasione e spero che gli enti finanziatori della ricerca in Italia e in Europa, gli scienziati del vecchio continente e, soprattutto, l'accademia italiana non perdano questa occasione. C'è ancora molto lavoro da fare, anche nella comunicazione all'opinione pubblica di queste metodologie, ma sono certo che ne avremo grande beneficio in termini di innovazione, con ricadute ancora difficili da immaginare completamente.

Zebrafish: modello sperimentale alternativo nella ricerca biomedica

Michele Navarra¹, Antonino Germanà²

¹Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina

²Dipartimento di Scienze Veterinarie e Zebrafish Neuromorphology Lab, Università degli Studi di Messina

Il pesce zebra o zebrafish (*Danio rerio*) è un piccolo pesce tropicale d'acqua dolce originario del sud-est asiatico (India settentrionale, nord del Pakistan, Nepal e Bhutan), chiamato così per le sue striature orizzontali sul fianco del corpo. Questo teleosteo appartenente alla famiglia dei Cyprinidae, allo stato attuale, rappresenta un interessante modello animale utilizzato nella ricerca biomedica, soprattutto nel campo dell'epigenetica e della biologia dello sviluppo (Veldman e Lin, 2008), della genetica molecolare (Driever *et al.*, 1996), della tossicologia (Peterson e Macrae, 2012) e del drug discovery (MacRae e Peterson, 2015). In questo piccolo pesce, infatti, attraverso

la transgenesi, le mutazioni e l'utilizzo delle sequenze morpholino è possibile riprodurre patologie neurodegenerative (Stewart *et al.*, 2014; Van Houcke *et al.*, 2015), cardiovascolari (Chico *et al.*, 2010; Asnani *et al.*, 2014), metaboliche (Santoro, 2014; Schlegel e Gut, 2015) ed oncologiche (Yen *et al.*, 2014; Barriuso *et al.*, 2015). L'utilizzo dello zebrafish in ambito sperimentale risale agli inizi degli anni '70, quando George Streisinger, biologo della Oregon University, impiegò questo modello animale per studi di biologia dello sviluppo (Streisinger *et al.*, 1981). Viste le sue similarità con i vertebrati superiori e con l'uomo, oggi lo zebrafish è ampiamente utilizzato come modello sperimentale alternativo ai topi ed ai ratti, rispetto ai quali presenta diversi vantaggi: 1) i costi di acquisto e di gestione degli zebrafish sono notevolmente inferiori a quelli dei roditori (da 1/100 a 1/1000 economicamente più vantaggioso rispetto al topo); 2) sono animali di piccole dimensioni (circa 2-4 cm di lunghezza in età adulta) che, quindi, possono essere stabulati in spazi piuttosto ridotti; 3) possiedono elevata capacità riproduttiva attraverso fecondazione esterna (producono intorno alle 200-300 uova in un singolo processo di accoppiamento) ed un rapido sviluppo embrionale. Inoltre, gli embrioni e le larve di zebrafish presentano la peculiare caratteristica di essere completamente trasparenti, permettendo, così, di seguire direttamente o tramite l'impiego di proteine fluorescenti (come la *green* e la *red fluorescent protein*, GFP e RFP, rispettivamente) le prime fasi dello sviluppo embrionale, impiegando comuni tecniche di imaging non invasive. Ciò è particolarmente utile per studiare l'impatto di una manipolazione genetica o gli effetti dell'esposizione a farmaci ed agenti tossici (Vliegenthart *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2014); 4) lo zebrafish possiede meccanismi fisiologici e fisio-patologici che sono molto simili a tutti i vertebrati e che sono comuni all'uomo: ad esempio, la suddivisione delle regioni encefaliche, l'organizzazione del fegato e del rene, la struttura della retina, etc... (Menke *et al.*, 2011; D'Angelo *et al.*, 2016); 5) il recente sequenziamento dell'intero genoma di zebrafish ha mostrato un'elevata

omologia con quello umano, suggerendo che circa l'82% dei geni associati ad importanti patologie umane ha un corrispettivo nello zebrafish (Howe K. *et al.*, 2013; Kettleborough *et al.*, 2013). Grazie a queste caratteristiche, lo zebrafish è ormai diventato un modello sperimentale pienamente riconosciuto dalla comunità scientifica, e per mezzo del quale è possibile riprodurre numerose patologie umane (Lieschke e Currie, 2007). Per questo motivo esso è ampiamente sfruttato nello screening di molecole biologicamente attive, ad un costo molto ridotto rispetto al classico modello murino (Lieschke e Currie, 2007). Lo zebrafish si è dimostrato un modello ideale anche per lo studio dei processi rigenerativi di organi adulti tra cui l'orecchio. Nell'uomo la causa principale dell'alterazione dell'equilibrio e della perdita dell'udito è la distruzione irreversibile delle cellule meccanosensoriali presenti nell'orecchio interno dei mammiferi, la quale può essere dovuta a fattori ambientali o genetici o all'impiego di alcuni farmaci quali gli antibiotici aminoglicosidici o il cisplatino (Monroe *et al.*, 2015). Nello zebrafish le cellule meccanosensoriali presentano caratteristiche morfologiche, funzionali e genetiche sovrapponibili alle cellule sensoriali presenti nell'orecchio interno dei mammiferi e sono sensibili alle medesime sostanze ototossiche per l'uomo (Germanà *et al.*, 2004, 2009, 2010, 2014). Inoltre, a differenza di quanto succede nei mammiferi, le cellule sensoriali dello zebrafish si rigenerano fisiologicamente per tutto l'arco temporale della vita, permettendo, così, una più agevole conduzione della sperimentazione *in vivo* che ha come oggetto lo studio delle alterazioni morfologiche e dell'espressione genica durante i processi di rigenerazione cellulare. L'impiego di zebrafish transgenici agevola il compito dello sperimentatore (Parinov *et al.*, 2004).

Bibliografia

Asnani A, Peterson RT. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Dis Model Mech*, 2014, 7 (7): 763-7.

Barriuso J, Nagaraju R, Hurlstone A. Zebrafish: a new companion for translational research in oncology. *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (5): 969-75.

Chico TJ, Milo M, Crossman DC. The genetics of cardiovascular disease: new insights from emerging approaches. *J Pathol*, 2010, 220 (2): 186-97.

D'Angelo L, Lossi L, Merighi A, de Girolamo P. Anatomical features for the adequate choice of experimental animal models in biomedicine: I fishes. *Ann Anat*, 2016, in press.

Dai YJ, Jia YF, Chen N, Bian WP, Li QK, Ma YB, Chen YL, Pei DS. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ Toxicol Chem*, 2014, 33 (1): 11-7.

Drierer W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhaus SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkuis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 1996, 123: 37-46.

Germanà A, Abbate F, González-Martínez T, del Valle ME, de Carlos F, Germanà G, Vega JA. S100 protein is a useful and specific marker for hair cells of the lateral line system in postembryonic zebrafish. *Neurosci Lett*, 2004, 365 (3): 186-9.

Germanà A, Laurà R, Montalbano G, Guerrero MC, Amato V, Zichichi R, Campo S, Ciriaco E, Vega JA. Expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in the lateral line system of zebrafish during development. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30 (5): 787-93.

Germanà A, Montalbano G, Guerrero MC, Laura R, Levanti M, Abbate F, de Carlos F, Vega JA, Ciriaco E. Sox-2 in taste bud and lateral line system of zebrafish during development. *Neurosci Lett*, 2009, 467 (1): 36-9.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churchev C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Lovelland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthavadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest

Crollius H, Rogers J, Stemple DL. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 2013, 496 (7446): 498-503.

Kettleborough RN, Busch-Nentwich EM, Harvey SA, Dooley CM, de Bruijn E, van Eeden F, Sealy I, White RJ, Herd C, Nijman IJ, Fényes F, Mehroke S, Scahill C, Gibbons R, Wali N, Carruthers S, Hall A, Yen J, Cuppen E, Stemple DL. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, 2013, 496 (7446): 494-7.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*, 2007, 8 (5): 353-67.

MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14 (10): 721-31.

Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek AP, Woutersen RA. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol Pathol*, 2011, 39 (5): 759-75.

Monroe JD, Rajadinakaran G, Smith ME. Sensory hair cell death and regeneration in fishes. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 131.

Montalbano G, Abbate F, Levanti MB, Germanà GP, Laurà R, Ciriaco E, Vega JA, Germanà A. Topographical and drug specific sensitivity of hair cells of the zebrafish larvae to aminoglycoside-induced toxicity. *Ann Anat*, 2014, 196 (4): 236-40.

Parinov S, Kondrichin I, Korzh V, Emelyanov A. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev Dyn*, 2004, 231 (2): 449-59.

Peterson RT, Macrae CA. Systematic approaches to toxicology in the zebrafish. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 433-53.

Santoro MM. Zebrafish as a model to explore cell metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25 (10): 546-54.

Schlegel A, Gut P. Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72 (12): 2249-60.

Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci*, 2014, 37 (5): 264-78.

Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 1981, 291 (5813): 293-6.

Van Houcke J, De Groef L, Dekeyser E, Moons L. The zebrafish as a gerontology model in nervous system aging, disease, and repair. *Ageing Res Rev*, 2015, 24 (Pt B): 358-68.

Veldman MB, Lin S. Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatr Res*, 2008, 64 (5): 470-6.

Vliegthart AD, Tucker CS, Del Pozo J, Dear JW. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury.

Br J Clin Pharmacol, 2014, 78 (6): 1217-27.

Yen J, White RM, Stemple DL. Zebrafish models of cancer: progress and future challenges. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 24: 38-45.

Test *in vivo* di tossicologia: uso del minipig per coniugare le richieste 3R con la necessità di dati affidabili su modelli animali “non-rodent”

Isabella Andreini

RTC S.p.A., Pomezia (RM)

Negli anni '50 alcuni ricercatori europei, avvertendo la necessità di ottimizzare l'uso di animali per la ricerca biomedica, hanno sviluppato il concetto delle 3R: *Replace, Reduce, Refine*.

Tali principi si propongono:

- di sostituire, laddove possibile, con test *in vitro* la sperimentazione su modelli animali;
- di ridurre il numero degli animali inclusi negli studi, evitando duplicazione di studi o l'effettuazione di studi inutili e infine;
- di rifinire il disegno degli studi limitando le procedure dolorose e scegliendo un modello meno “delicato”.

Nei decenni seguenti abbiamo assistito ad una progressiva e sempre maggiore inclusione dei principi delle 3R nei documenti scientifici e regolatori, comprese le linee guida che indicano come affrontare lo sviluppo preclinico di farmaci o presidi medico-chirurgici o i test di sicurezza non clinica per prodotti chimici.

A distanza di oltre mezzo secolo dalla prima pubblicazione sui principi delle 3R, in ambito scientifico e regolatorio è riconosciuto che siamo ancora lontani dal poterci affidare a soli studi *in vitro* prima di trattare i pazienti con nuovi farmaci o permettere l'esposizione di lavoratori a nuovi prodotti chimici. Per motivi etici è dunque necessario limitare i rischi e identificare i pericoli attraverso studi *in vivo* che vengano disegnati con criteri scientificamente validi e condotti in modo rigoroso.

Dopo la tragedia della talidomide, la cui tossicità per il feto non era stata identificata con gli studi sul ratto, è diventato obbligatorio per il programma di sicurezza preclinica dei nuovi farmaci non limitare la sperimentazioni a prove su topi e ratti, ma includere dati relativi a una specie non-rodente.

Inizialmente la facilità di manipolazione e le ridotte dimensioni hanno visto l'uso del cane (beagle) o della scimmia (macaco) imporsi come modelli di elezione per gli studi di sicurezza. La scimmia, soprattutto in Europa, è stata tradizionalmente considerata solo come alternativa al cane in casi di eccessiva sensibilità del cane o sperimentazione di prodotti biotecnologici come proteine o anticorpi monoclonali per i quali il cane non era un modello rilevante.

A partire dagli anni '60 il maiale è stato usato come modello animale, soprattutto in chirurgia per alcune caratteristiche anatomiche e fisiologiche (ad es. cuore e sistema gastroenterico) che lo accomunano all'uomo. Le notevoli dimensioni e l'indole poco docile ne hanno scoraggiato l'impiego per studi con trattamenti ripetuti fino agli anni '90, quando un'azienda danese (Ellegaard) ha acquisito i diritti di allevamento e vendita di un suino di dimensioni ridotte (nanismo proporzionale), selezionato presso l'Università di Goettingen. Progressivamente l'uso di questo modello si è andato diffondendo in tossicologia. Inizialmente veniva utilizzato quasi esclusivamente per alcune tipologie di studi, come quelli dermali, per i quali è importante utilizzare un modello animale con la struttura della pelle simile a quella dell'uomo e un colore chiaro che permetta di evidenziare i primi segni di irritazione e fototossicità.

Negli anni a seguire, l'introduzione di questo modello all'interno dei laboratori di ricerca biomedica e la buona resistenza del minipig rispetto al cane hanno spinto i ricercatori a testare sul minipig molti altri prodotti ad applicazione sistemica per i quali si sono evidenziati i limiti del cane, tra questi anti-infiammatori non-steroidi (FANS), prodotti simpatico-mimetici, anti-ipertensivi, benzodiazepine, antitumorali

citotossici e alcuni eccipienti come i polisorbati.

Per molti di questi prodotti il cane si è dimostrato eccessivamente sensibile con ripercussioni negative dal punto di vista scientifico ed etico. Oltre allo sviluppo di farmaci tradizionali, il minipig viene anche preso in considerazione per lo sviluppo di farmaci biologici.

Anche se ancora il minipig non è stato utilizzato per l'intero sviluppo regolatorio di un prodotto biologico, ci sono prove della rilevanza di questo modello addirittura per alcuni anticorpi monoclonali (es. Tocilizumab). Interessante considerare il minipig soprattutto per gli studi di farmacocinetica per i prodotti biologici che vengono normalmente somministrati per via sottocutanea. Infatti, come già menzionato, la struttura della pelle del minipig è assai simile all'uomo e permette quindi di valutare nel modo più appropriato l'assorbimento e la distribuzione.

Nella tossicologia preclinica si è andato affermando il concetto di selezione della specie rilevante che deve essere condotta attribuendo il giusto peso all'evidenza scientifica (rilevanza del modello) rispetto al danno che si può arrecare agli animali in base alla loro sensibilità.

La ricerca sul genoma rappresenta un utile strumento per rifinire e ridurre gli esperimenti *in vivo* in accordo ai principi delle 3R. Con la disponibilità di informazioni sul genoma di topo, ratto, minipig, cane e scimmia si può selezionare in modo più sofisticato il modello rilevante riducendo così il numero di animali necessari per una risposta predittiva degli effetti del prodotto sull'uomo.

Nel 2003 è stato fondato il *swine genome consortium* a cui partecipano grandi aziende che sviluppano proteine terapeutiche e anticorpi monoclonali e che vorrebbero, laddove possibile, sostituire la scimmia con l'uso del minipig prima delle prime prove nell'uomo.



Antidotes in Depth 2016

Pavia, 21-23 settembre 2016

Si ringrazia per il contributo non condizionato



Seguici su Facebook  e Twitter 

SITOX Informa è scaricabile on line.
Visita il nostro sito www.sitox.org

SITOX INFORMA - Periodico della Società Italiana di Tossicologia Fondata nel 1967

Riconosciuta con DPR 16/05/1972, n. 376 - C.F.: 96330980580

Iscritta Registro Persone Giuridiche Prefettura di Milano n. 3512 pag. 606 vol. II

Anno XIX n. 1 - Aprile 2016

Direttore Responsabile: Sarah Vecchio

Comitato Editoriale: Isabella Andreini, Emanuela Corsini, Elena De Felip, Ivano Eberini, Marco Pivato, Aurelia Tubaro

Segreteria Editoriale: Ida Ceserani

CONSIGLIO DIRETTIVO

Presidente: Patrizia Hrelia

Presidente Eletto: Corrado Lodovico Galli

Consiglieri: Isabella Andreini, Orazio Cantoni, Angelo Moretto, Michele Navarra, Sarah Vecchio

Segretario: Francesca Maffei

Past President: Carlo Alessandro Locatelli

Sede Legale: Viale Abruzzi, 32 - 20131 Milano

Sede Operativa: Via Giovanni Pascoli, 3 - 20129 Milano - Tel 02 29520311 - Fax 02 700590939 - E-mail: sitox@comm2000.it - Sito Internet: <http://www.sitox.org>

Impaginazione e stampa: RB stampa e grafica - Torino

SITOX Informa - Registrazione del Tribunale di Milano, N. 332 del 31.05.97