

La sperimentazione animale: un metodo obsoleto e fuorviante

di Gianni Tamino

Abstract. L'utilizzo di modelli animali per conoscere la fisiologia o la tossicologia a livello umano o per studiare farmaci e terapie da utilizzare sull'uomo risale a molto tempo fa, ma si è sviluppato soprattutto nell'Ottocento. Da allora la ricerca è cambiata e sono diventati sempre più evidenti i limiti del modello animale per ottenere dati estrapolabili all'uomo. Negli studi sperimentali il modello animale è stato assunto come *gold standard*, cioè standard di riferimento, solo sulla base di un'ipotesi di poter estrapolare i dati ottenuti sugli animali all'uomo, ipotesi mai verificata. Per contro esistono diverse evidenze e dati di letteratura che possono far supporre, semmai, l'infondatezza dell'assunzione sopracitata. Di conseguenza le potenziali alternative non vengono impiegate perché i risultati non affidabili degli esperimenti sugli animali sono usati come standard di riferimento. Ciò significa che ogni nuovo metodo, ogni nuovo test viene validato confrontandolo con i risultati poco attendibili ottenuti dalla sperimentazione su animali, anche se tale pratica non è mai stata validata. Recentemente la statunitense Food and Drug Administration (FDA) ha previsto di introdurre la modellazione computazionale e altri metodi innovativi con dati riferibili all'essere umano (*human based*), come l'utilizzo di organoidi, per sostituire la sperimentazione animale negli studi preclinici sulla sicurezza dei farmaci.

Sommario: Introduzione - La normativa - Aspetti etici - La critica scientifica- La sperimentazione animale non può essere considerata *gold standard* - Le alternative - La recente scelta della FDA - Considerazioni finali.

Parole chiave: sperimentazione animale; *gold standard*; ricerca *human based*; organoidi.

Introduzione

Già ai tempi di Claude Bernard (1813- 1878), un antesignano della sperimentazione sugli animali per capire la fisiologia umana, sono sorti movimenti contro la vivisezione¹, soprattutto per ragioni etiche. In tempi più recenti si è sviluppata un'opposizione alla vivisezione anche all'interno dello stesso mondo scientifico, sulla base di considerazioni di ordine biologico e medico.

Va ricordato che la sperimentazione animale trae origine da una visione meccanicista e riduzionista della natura, che assimila, come ipotizzavano Cartesio e La Mettrie², animali e uomini a macchine e, in quest'ottica, l'ani-

male-macchina diviene un modello per l'uomo-macchina. Questa logica dovrebbe fondarsi su precise corrispondenze tra uomo e animali; ogni biologo sa invece che gli animali sono, come tutti gli organismi viventi, sistemi complessi e non macchine e che animali diversi possono presentare alcune caratteristiche anatomiche e fisiologiche simili o uguali, ma molte altre in parte o del tutto diverse.

I biologi sono certamente più portati a una visione non riduzionista della realtà, e l'eminento biologo Marcello Buiatti, nel suo libro *Lo stato vivente della materia* spiega come, a mano a mano che la materia si organizza assumendo una struttura sempre più comples-

sa, emergono inevitabilmente proprietà che dipendono dai nuovi livelli di organizzazione: la materia vivente, dunque, arriva ad acquisire proprietà non deducibili dalle caratteristiche delle componenti più semplici.

Nei sistemi complessi tutte le parti sono collegate tra loro da relazioni o connessioni, come nelle reti: esempi di reti sono le cellule di un organismo, i neuroni del sistema nervoso, i geni che costituiscono il programma di un individuo. Nell'approccio sistemico sono quindi importanti le relazioni tra le parti più che la somma delle parti (approccio riduzionista). Il modello animale ha fatto perdere di vista le relazioni che intercorrono tra ambiente e organismi e tra le varie parti di un organismo, ignorando l'individuo nel suo insieme e nel suo contesto.

Inoltre, gli animali usati per gli esperimenti sono animali selezionati artificialmente, tenuti in gabbia senza quelle relazioni e quegli stimoli indispensabili a realizzare le proprie caratteristiche di specie e a sviluppare potenziali autodifesa. Così l'animale da laboratorio è un animale che non corrisponde a quello che vive nel proprio ambiente naturale e tutti gli esperimenti fatti su di lui non sono neppure estrapolabili ad altri animali della sua stessa specie, che vivono in un normale contesto spazio-temporale. Tantomeno sono estrapolabili alla specie umana!

La normativa

In tutti i paesi dell'Unione europea è in vigore la Direttiva 2010/63/EU che si prefigge di proteggere gli animali usati a scopi scientifici e ridurre l'utilizzo, e invita le istituzioni ad impegnarsi in questa direzione. Purtroppo, a parole le intenzioni sono buone, ma i risultati in termini di riduzione dell'uso di animali è stato scarso.

Infatti, tutti i nuovi composti utilizzati come farmaci devono passare attraverso una fase preclinica, con utilizzo di animali, in cui vengono testati per verificarne la sicurezza e l'efficacia prima di passare alla sperimentazione clinica sull'uomo. Ogni anno solo in Italia sono oltre 450 mila gli animali usati in laboratorio, oltre 9 milioni nell'Unione europea, per testare farmaci, prodotti chimici, pesticidi, detersivi ecc. (dati ottenuti in base alla Direttiva 2010/63/UE).

Ancor prima dell'approvazione della Direttiva del 2010, c'è stato un forte movimento che, partendo da considerazioni di natura etica, ha chiesto l'eliminazione dei test sugli animali per valutare la sicurezza dei prodotti cosmetici, con la convinzione che la richiesta di bellezza

non potesse giustificare le sofferenze inflitte agli animali nei test. Dopo un iter relativamente lungo, si è finalmente approdati all'approvazione del Regolamento EC 1223/2009 sui prodotti cosmetici che sancisce la proibizione di testare su animali sia i prodotti finiti che gli ingredienti cosmetici. In realtà, quest'ultima richiesta è poco perseguibile, perché è sufficiente dire che il test è effettuato per garantire la sicurezza dei lavoratori che preparano sia l'ingrediente che il prodotto cosmetico per giustificare da un punto di vista legale i test su animali. Inoltre, la proibizione prevista dal regolamento sui cosmetici è inerente solo ai test tossicologici, escludendo i test ecotossicologici. Comunque, è importante rilevare che nell'ambito dei legislatori è iniziata a circolare la richiesta di limitare i test sugli animali e soprattutto si è cominciato a discutere di test sostitutivi. Tuttavia, nelle istituzioni europee prevale ancora l'idea che eticamente sia lecito sperimentare sugli animali, se i risultati ottenuti aiutano a migliorare la salute umana.

Aspetti etici

Il pensiero occidentale è caratterizzato da un forte antropocentrismo, ovvero tutto viene riferito all'uomo come unico depositario di valori. Vi è la presunzione che gli esseri umani siano al vertice del mondo vivente e che debbano avere un ruolo centrale e di dominio, ciò che ha portato alla autoassoluzione dalle crudeltà e sopraffazioni sugli animali, considerati inferiori o incapaci di soffrire e sentire.

A questa visione si oppone l'antispecismo, cioè la posizione etica che rifiuta ogni forma di discriminazione basata sulla specie, nonché l'ipotesi che gli interessi degli esseri umani abbiano una maggiore importanza rispetto a quelli degli altri animali. Gli antispecisti sostengono che tutti gli esseri senzienti, capaci di provare dolore o piacere, meritano considerazione morale. Questa posizione implica che le pratiche che contemplano sfruttamento o crudeltà verso gli animali, come l'allevamento intensivo, la sperimentazione animale o la caccia siano moralmente inaccettabili.

Le attuali conoscenze scientifiche non consentono più di considerare gli animali non umani irrazionali e insensibili: il riconoscimento delle loro capacità emotive, cognitive, e della loro sensibilità ha abbattuto il muro posto dall'antropocentrismo a difesa dei privilegi dell'umanità e minato alla base le pretese di una *superiorità ontologica* della nostra specie sulle altre.

Questa nuova visione pone il problema che

anche gli animali sono depositari di diritti, quanto meno il diritto a vivere secondo le caratteristiche della propria specie. Come abbiamo visto, per quanto riguarda la legislazione in materia di sperimentazione animale, molte persone ritengono eticamente inaccettabile sacrificare animali per cose frivole come la cosmesi, ma se si tratta di farmaci o terapie che possono salvare vite umane, l'atteggiamento cambia.

A questo punto dobbiamo domandarci se e quanto siano utili gli esperimenti su animali per ottenere risultati estrapolabili agli esseri umani, al fine di avere trattamenti, farmaci e terapie mediche.

Gli scienziati che difendono gli esperimenti sugli animali insistono che sono indispensabili per effettuare studi clinici sicuri, mentre sia gli attivisti per i diritti degli animali che gli scienziati antivivisezionisti sostengono la loro inutilità.

La critica scientifica

All'opposizione per motivi etici negli ultimi tempi si è aggiunta quella di tipo scientifico che parte dagli stessi ricercatori che hanno verificato la inutilità e talora la pericolosità degli studi sugli animali per ottenere indicazioni applicabili alla specie umana.

Infatti, qualunque dato ottenuto sull'animale può risultare identico, simile o completamente diverso a livello umano e, anche se "a posteriori" verifichiamo una certa percentuale di coincidenza dei dati, tuttavia, "a priori" non sappiamo se un farmaco o una sostanza saranno utili, innocui o tossici per l'uomo. È dunque l'uomo, su cui è obbligatorio provare qualunque farmaco o terapia, la vera "cavia", e la prova sull'animale è solo l'alibi per rendere accettabile una sperimentazione sull'uomo, spesso eticamente discutibile.

Queste considerazioni hanno trovato spazio, già vari anni fa, in un articolo di N. D. Barnard e S. R. Kaufman (1997): «Gli animali vengono prevalentemente utilizzati in laboratorio come 'modelli': mediante manipolazione genetica, interventi chirurgici o iniezione di sostanze estranee, i ricercatori producono in essi patologie che costituiscono un modello delle condizioni umane. Questo paradigma della ricerca è però irto di difficoltà. Le pressioni evolutive hanno prodotto sottili, ma significative, differenze tra le specie. Ogni specie ha molteplici sistemi di organi che hanno interazioni complesse. Uno stimolo applicato a un particolare sistema di organi perturba l'insieme delle funzioni organiche secondo modalità spesso imprevedibili. Questa incer-

tezza mina gravemente la possibilità di estrapolare i dati ottenuti con un animale ad altre specie animali, uomo compreso I 'modelli' animali sono, nel migliore dei casi, una buona imitazione delle condizioni umane, ma nessuna teoria può essere approvata o respinta sulla base di un'analogia. Cionondimeno, quando si discute sulla validità di teorie contrapposte in medicina e biologia, si citano spesso come prova gli studi condotti su animali. In un contesto di questo tipo, gli esperimenti sugli animali servono, in primo luogo, come accorgimento retorico. E, utilizzando differenti tipi di animali in differenti protocolli, gli sperimentatori possono trovare prove a sostegno di qualunque teoria. Per esempio, si sono utilizzati esperimenti sugli animali sia per provare sia per negare il ruolo cancerogeno del fumo».

Per quanto riguarda i farmaci, la non predittività di dati ottenuti su animali è ben nota da tempo al mondo scientifico. Già nel 1953 Sir Howard Florey, uno degli scopritori della penicillina, affermò: «Fu una fortuna che nelle prove iniziali di tossicità impiegammo topi, perché se avessimo impiegato le solite cavie avremmo concluso che la penicillina è tossica, e probabilmente non avremmo superato le difficoltà di produrre la sostanza per provarla sull'uomo». Si pensi poi, ad esempio, all'ischemia cerebrale: David Wiebers e collaboratori della "Mayo Clinic" (1990), in uno studio dimostrarono che 25 composti in grado di ridurre i danni di tale malattia in vari roditori, gatti e altri animali non risultavano efficaci sull'uomo.

Anche per lo studio dei tumori valgono ragionamenti analoghi, ad esempio il prof. U. Veronesi (1986), nel suo famoso libro *Un male curabile*, afferma: «I tumori dei topi, dei ratti, dei polli e delle cavie sono sostanzialmente diversi da quelli dell'uomo, diverso il loro modo di formarsi, diverso è il loro modo di accrescersi, diverso è il loro modo di metastatizzare); il prof. Sabin in una conferenza tenuta nel giugno del 1978 a Napoli spiegava: «I cancri da laboratorio non hanno nulla a che vedere con quelli naturali dell'uomo». Analogamente molti farmaci e terapie antitumorali sono risultati efficaci sui roditori, ma non sugli esseri umani.

Nel 2004 Pandora Pound e alcuni collaboratori hanno scritto sul *British Medical Journal*: «E' opinione diffusa, sia tra il pubblico che in ambiente medico, che la ricerca sugli animali contribuisca a curare le malattie nell'uomo, tuttavia, tale ipotesi non è suffragata da sufficienti prove. Sono pochi i metodi disponibili per valutare la rispondenza e rilevanza clinica della ricerca sugli animali e pertanto il con-

tributo medico (distinto da quello scientifico) di quest'ultima rimane incerto. Prove non sostanziali e affermazioni infondate sono spesso addotte come giustificazione della ricerca sugli animali, come quando si dichiara che la sua necessità "è ovvia", o che "la sperimentazione sugli animali è un valido metodo di ricerca che si è dimostrato tale negli anni". Simili asserzioni sono inadeguate come prove in un ambito di ricerca tanto controverso. Noi riteniamo che ci sia bisogno di una analisi sistematica dei metodi di ricerca attuali e futuri».

La stessa Pandora Pound (2014) è tornata sull'argomento 10 anni dopo, sempre sul *British Medical Journal*, affermando che se gli studi sugli animali producono risultati inaffidabili, qualsiasi sofferenza subita dagli animali perde la sua giustificazione morale perché il loro uso non può assolutamente contribuire al beneficio clinico. Ecco, dunque, che la critica scientifica alla vivisezione fornisce elementi utili all'obiezione di natura etica!

Seok Junhee e collaboratori (2013) hanno scritto su PNAS un articolo sulla sepsi, che metteva in luce la grande diversità tra l'infiammazione che si sviluppa nei topi rispetto alla specie umana. Ronald W. Davis, esperto di genetica presso la Stanford University e coautore del nuovo studio, spiegò al *New York Time* (12 febbraio 2013) che il gruppo aveva cercato di pubblicare le sue scoperte in diverse riviste, ma l'obiezione era stata che i ricercatori non avevano dimostrato che i topi fornissero la stessa risposta. «Erano così abituati a fare studi sui topi», aggiunse R.W. Davis «che per loro era quello il solo modo di convalidare le cose. Hanno la cura dei topi talmente radicata che dimenticano che noi stiamo, invece, cercando di curare gli esseri umani. Questo ci ha fatto pensare: lo stesso avviene nei topi, oppure no?».

Il gruppo decise di indagare, aspettandosi di trovare alcune somiglianze. Ma quando i dati furono analizzati, non ve ne era alcuna. I fallimenti dei farmaci divennero chiari. Ad esempio, un gene poteva essere attivato spesso nei topi, mentre il gene equivalente veniva soppresso negli esseri umani. Quindi una sostanza che agiva nei topi disattivando un gene poteva avere una risposta letale nell'uomo.

Già nel 2009 il noto farmacologo Thomas Hartung affermava su *Nature* che la stessa sostanza chimica ha una corrispondenza tra animali diversi tra il 53 e il 60 per cento, risultato analogo a quello riportato da *Lancet* il 4 giugno 2011 (corrispondenza compresa tra il 37 e il 50 %): ma ciò significa che otterremmo un risultato simile anche lanciando una moneta. Ed Hartung aggiungeva che gli esseri

umani non sono topi di 70 chili.

Eppure, da decenni sono disponibili metodi alternativi che utilizzano materiali provenienti da individui umani e che risultano più attendibili rispetto alla sperimentazione sugli animali!

La sperimentazione animale non può essere considerata gold standard

Alla luce delle considerazioni sopra esposte non sembra giustificato considerare i risultati ottenuti sugli animali come standard di riferimento per qualunque altro metodo di ricerca (Tamino, 2024)

Tuttavia, nel 2010 la SIF, Società Italiana di Farmacologia, riportava: «Oggi nessuna sperimentazione clinica di un nuovo farmaco può essere autorizzata se la molecola in questione non è stata prima testata in vitro e sull'animale. Il *gold standard* della sperimentazione animale è un *randomized controlled trial*, che distribuisca un adeguato numero di animali (idealmente con caratteristiche omogenee) in un gruppo trattato che verrà confrontato con un gruppo non trattato o sottoposto a trattamento standard... In un campione rappresentativo di animali, la significatività statistica, pur non essendo chiaramente una prova definitiva, costituisce una forte evidenza che il trattamento funziona e che quindi può essere testato sugli esseri umani... I modelli sperimentali basati sul ricorso a specie animali diverse dall'uomo rimangono un caposaldo della moderna ricerca farmacologica».

Ma da tempo alcuni test su animali sono stati messi in discussione per la loro scarsa affidabilità, come nel caso di vari test di tossicità, come la DL 50 o il *draize test*, che a torto si pensa non siano più utilizzati.

In tossicologia, il termine DL50 sta per dose letale 50 e si riferisce alla quantità di una sostanza in grado di uccidere, in una unica somministrazione, il 50% (cioè la metà) di una popolazione campione di animali da esperimento. Questa misurazione, data la modalità di somministrazione, è un modo per testare il potenziale tossico di una sostanza solo a breve termine (tossicità acuta) e non si riferisce alla tossicità a lungo termine (cioè dovuta a contatto con modiche quantità di una certa sostanza per lunghi periodi). Ma questo test non è per niente predittivo di quanto avverrà nella specie umana; ad esempio, la digitossina (farmaco per l'insufficienza cardiaca, estratto dalla digitale), presenta nei ratti una "DL50" 670 volte superiore rispetto ai gatti: come possia-

mo sapere quale valore possa avere un significato per l'uomo? Analogamente la diossina che è altamente tossica per gli esseri umani, lo è anche per il porcellino d'India, ma la tossicità del composto per il criceto risulta alcune migliaia di volte inferiore. Anche il glicole etilenico, usato nei liquidi antigelo, ma anche in alcuni farmaci e cosmetici, risulta più tossico nell'uomo che in altre specie animali. La DL50 quindi permette di dimostrare tutto e il contrario di tutto: basta scegliere la specie giusta... È quindi chiaro che la conoscenza della dose letale di una sostanza per vari animali, non è predittiva per la tossicità della stessa sostanza su un altro animale, uomo compreso, come avevano già affermato Zbinden e Flury-Roversi (1981), in compenso richiede il sacrificio di un numero elevato di animali.

Infatti, un singolo test richiedeva all'inizio ben 100 animali (poi ridotti a 20); per queste ragioni nel 2002 l'organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OECD, 2002), di cui l'Italia fa parte dal 1962, ha messo ufficialmente al bando tale test (conosciuto anche come *guideline 401*) e ha promosso lo sviluppo di nuovi test in grado di ridurre o eliminare l'impiego di animali. Ma i test ancora ammessi ed obbligatori sono molto simili, come si può leggere nella Comunicazione della Commissione relativa all'attuazione del regolamento UE n. 283/2013 (1 marzo 2013), che stabilisce i requisiti relativi ai dati applicabili alle sostanze attive, in conformità del regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari. Alla voce "TG 420" (*Fixed Dose Procedure*) è scritto: «Si basa sulla somministrazione a 5 animali di una dose iniziale da selezionare tra 5, 50, 500 o 2000 mg/kg (dosi fisse), che si sia dimostrata in grado di produrre in uno studio pilota chiari segni di tossicità. Se nessuna evidente tossicità si manifesta, si procede alla somministrazione della dose fissa superiore e così via, fino all'identificazione della dose tossica. La caratteristica distintiva di questo metodo è che l'endpoint rilevante non è rappresentato dalla letalità, ma da quelli che vengono indicati come chiari segni di tossicità». Come si vede non è la DL50, ma è un metodo molto simile, anche se utilizza un numero inferiore di animali: non cambia però la non predittività del metodo!

Un ragionamento analogo può essere fatto anche per il *draize test*, utilizzato per verificare il grado di irritazione oculare e cutanea provocata da una sostanza. Come riporta Pietro Croce (2000), anche questo test è grossolano, mal riproducibile e non estrapolabile all'uomo: una stessa sostanza provata in 24 diversi

laboratori americani ha dato valori di irritazione variabili da 7 a 79, cioè da "non irritante" a "molto irritante".

La spiegazione della diversa reazione alla stessa sostanza in animali di specie diverse va cercata, ad esempio, nel fatto che animali anche molto simili possiedono piccole differenze genetiche che producono enzimi, leggermente diversi, ma tali differenze sono sufficienti a modificare le condizioni chimico-fisiche alle quali tali enzimi esplicano la loro azione. Inoltre, i processi metabolici sono ben diversi tra specie e specie e ad esempio diversa è la detossificazione a disposizione, cioè la modalità per eliminare, dopo averla modificata una sostanza tossica, farmaci compresi. Così la digitossina ha una vita media nel plasma di 18 ore nel ratto, ma di 216 nell'uomo; una cosa analoga si verifica con il fenilbutazone (72 ore nell'uomo e 6 nel ratto), ma in questo caso, si badi bene, una scimmia del genere Rhesus, cioè un primate come l'uomo, ha un tempo di metabolizzazione simile a quello del ratto, cioè 8 ore (Levine, 1978). Le diverse vie metaboliche che caratterizzano i diversi animali dipendono da adattamenti evolutivi alle diverse condizioni di vita.

Inoltre va ricordato che la regolazione dell'espressione genica e le modifiche di natura epigenetica (cioè modifiche che non alterano la sequenza del DNA) sono diverse in specie diverse: la scoperta che l'informazione contenuta nel DNA possa subire modificazioni post-trascrizionali ha minato la certezza della corrispondenza univoca e incontrovertibile tra DNA e proteina e quindi anche animali con genoma molto simile possono avere adattamenti e risposte alle situazioni ambientali molto diverse (Tamino, 2023). Un caso emblematico di diversa espressione genica ci viene fornita dallo studio già citato sulla sepsi.

Le alternative

Uno dei più importanti documenti a favore di metodi alternativi (o meglio sostitutivi) alla sperimentazione animale è arrivato dall'US National Research Council, che, nel 2007, ha pubblicato *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*, in cui viene annunciata una rivoluzione nella valutazione di tossicità: «questa si allontanerà dal modello animale - inaffidabile e non predittivo per l'uomo - per fare ricorso al potenziale di una ricerca assai più moderna. Tale cambiamento viene definito un "cambiamento epocale [...] di quelli che danno un nuovo corso alla storia della scienza, come è avvenuto con la scoperta della penicillina, della doppia elica del DNA, del primo computer ...».

Come ha dichiarato Herman Koeter, già direttore dell'EFSA (Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare) nel comunicato stampa di chiusura del 7° Congresso Mondiale sulla Sperimentazione Animale e i Metodi Alternativi (Roma, 2009), cui hanno partecipato centinaia di scienziati da tutto il mondo, «Le nuove tecnologie sono capaci di raccogliere una quantità mai raggiunta prima di informazioni sui possibili effetti avversi recati da una sostanza ai sistemi biologici. Sono anche in grado di generare una quantità di conoscenza di gran lunga maggiore di quella che fino ad oggi abbiamo saputo individuare e capire. Esse ci faranno considerare, in un futuro assai vicino, l'uso degli animali a fini sperimentali estremamente obsoleto».

Successivamente Thomas Hartung (2009), farmacologo dell'Università di Costanza, in un articolo, su *Nature*, affermava: «Solo un radicale rinnovamento della sperimentazione tossicologica ci consentirà di affrontare le prossime sfide per la tutela della salute e dell'ambiente».

Ma già oltre trent'anni fa anche l'Unione europea si è posta il problema della sostituzione dei metodi che impiegano animali, per rispondere sia a richieste provenienti dalla società civile che dal mondo scientifico, con particolare riguardo all'abolizione di test su animali nel campo della cosmetica, di cui abbiamo parlato in precedenza. Nel 1991 la Commissione europea ha istituito l'ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) per trovare alternative all'impiego degli animali a fini sperimentali o ad altri scopi scientifici. L'ECVAM ha coordinato la valutazione di sostanze chimiche e prodotti di vario genere, tra cui farmaci, vaccini, dispositivi medici, cosmetici, prodotti per usi domestici e prodotti agricoli, ecc. A partire dal 2011 le attività dell'ECVAM sono state trasferite all'EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing).

L'obiettivo dei metodi sostitutivi è anzitutto quello di utilizzare dati ottenuti su sistemi biologici riferibili alla specie umana (*human based*), come cellule, tessuti, organi, processi metabolici, ecc., valutando poi i risultati, ad esempio, con sistemi computerizzati che simulino il comportamento dell'organismo umano *in toto*. In questa direzione vanno anche nuovi metodi, quali le nuove colture in vitro in tre dimensioni, che riproducono l'ambiente umano "in vivo"; le colture integrate multiorgano, in cui più organi, fisicamente separati, sono interconnessi dalla circolazione sistemica; i bioreattori multicompartimentali, che permettono di simulare le interazioni tra organi

dell'organismo intero e la reazione a farmaci e sostanze, ma soprattutto gli *organs on a chip*, organoidi che simulano il funzionamento degli organi umani.

Come spiegano Sarah Adler e coll. (2008), particolarmente interessante è la possibilità di utilizzare nei metodi citati cellule staminali umane, considerato dagli autori «il metodo più promettente per valutare la tossicità in vitro».

Secondo Anna Loewa, James J. Feng e Sarah Hedtrich (2023), la ricerca biomedica sta subendo un cambio di paradigma a causa dei notoriamente alti tassi di fallimento dell'attuale processo di sviluppo dei farmaci. I principali fattori di questa transizione sono i limiti dei modelli animali, che soffrono di differenze interspecifiche e di scarsa previsione delle condizioni fisiologiche e patologiche umane. Per colmare questa lacuna, sono in fase di sviluppo modelli di malattie umane bioingegnerizzate; nuovi studi preclinici e clinici possono beneficiare di questi modelli, concentrandosi su organoidi, modelli di tessuti bioingegnerizzati e organi *on chip*.

Negli ultimi anni sono stati predisposti, tra gli altri, organoidi di reni, anche vascolarizzati, mini placente, organoidi di parti del cervello e così via. Queste tecniche possono dunque essere impiegate per la ricerca tossicologica e di nuovi farmaci, nello studio dei tumori e di loro terapie, ma anche di malattie virali come il Covid e di specifici vaccini, oppure di malattie neurodegenerative come il Parkinson o della biologia e delle patologie dello sviluppo, per citare solo alcuni filoni di ricerca possibili.

A questo proposito, sulla rivista *Nature Methods* dell'11 febbraio del 2019 è apparso un articolo sui primi reni in miniatura completi di vasi sanguigni. «Questo importante progresso apre nuove strade per testare accuratamente la tossicità di farmaci in vitro in compartimenti di nefroni differenziati e modellare malattie renali, come il rene policistico, che colpiscono specifiche strutture e tipi di cellule, usando cellule staminali derivate dal paziente come punto di partenza».

C'è poi una crescente necessità di modelli preclinici avanzati ed economici per accelerare lo sviluppo di farmaci antitumorali. Come ha affermato Nandini Dhiman (2019): «Mentre costosi modelli animali non riescono a predire i risultati clinici sull'uomo, modelli in vitro come i chip microfluidici ("tumor-on-chip") stanno mostrando una promessa incredibile nel prevedere e fornire significativi risultati preclinici di screening farmacologico. La ricerca sul "tumore su chip" è cresciuta enormemente in tutto il mondo ed è ampia-

mente accettata dalle aziende farmaceutiche come strumento di sviluppo di farmaci».

Vi è poi l'epidemiologia molecolare, una scienza emergente che collega i fattori genetici, metabolici e biochimici a dati epidemiologici sull'incidenza di malattie, e la tossicogenomica, un metodo di ricerca per monitorare l'espressione dei geni, che consente di osservare il modo in cui una determinata sostanza chimica altera la funzione dei geni all'interno di una cellula umana. In altre parole, l'unico modello dell'uomo è l'uomo stesso.

La recente scelta della FDA

Fino a poco tempo fa negli USA, prima che i farmaci venissero sperimentati sull'uomo, dovevano essere eseguiti test su almeno due specie animali, di solito ratti e cani. Ma nel dicembre 2022, il Presidente Biden ha firmato l'*FDA Modernization Act*, che ha modificato l'originale *FDA Act* del 1938. Con alcune piccole modifiche, la legge ha aperto la porta a test non basati sugli animali nelle sperimentazioni precliniche. Tutto ciò rende più veloce e più facile per le aziende farmaceutiche identificare farmaci sicuri ed efficaci e per i cittadini significa trattamenti migliori e potenzialmente più economici.

La FDA (Food and Drug Administration) ha ufficialmente riconosciuto che il progresso scientifico e tecnologico ci ha portati a superare una soglia decisiva: i modelli animali sono diventati obsoleti.

Ci stiamo spostando dalla sperimentazione animale verso sistemi sostitutivi basati sulla biologia umana. Secondo una roadmap pubblicata ad aprile 2025, la FDA prevede di introdurre modelli computazionali e altri metodi innovativi per sostituire la sperimentazione animale negli studi preclinici sulla sicurezza dei farmaci. Incoraggiando gli sponsor farmaceutici ad adottare gli *organs on chip*, la modellazione in silico, gli organoidi e altri test in vitro, la FDA mira a ridurre la sperimentazione animale al punto che diventi "l'eccezione piuttosto che la norma" entro 3-5 anni.

Il commissario della FDA Marty Makary, presentando la roadmap, ha affermato che potrebbe segnare l'inizio della fine dell'utilizzo di animali nella ricerca biomedica. La FDA si impegna a validare nuovi metodi, sviluppare linee guida e standard aggiornati e monitorare i risultati.

Sul fronte normativo, lo spazio d'azione si è improvvisamente aperto: c'è la volontà politica, e FDA, in collaborazione con il National Institutes of Health (NIH) e l'Advanced Re-

search Projects Agency for Health (ARPA-H), hanno già gettato le basi per promuovere metodi innovativi nella valutazione preclinica. Il Congresso vuole accelerare il cambiamento, e il Dipartimento della Salute statunitense sta istituendo un nuovo ufficio al NIH per promuovere tecnologie basate sull'essere umano.

Considerazioni finali

È necessario che il mondo della ricerca e la pubblica opinione europea continuino a chiedere con insistenza un cambio di paradigma, per garantire la salute dei cittadini, passando dagli obsoleti test sugli animali a metodi *human based*. Inoltre, servono fondi adeguati per la ricerca senza animali e iniziative, anche a livello internazionale, per favorire la validazione e l'obbligatorietà, quando disponibili, di metodi scientifici *human based* validati.

A questo proposito vorrei ricordare che:

- 1) Attualmente, secondo l'ECVAM (2018), sono disponibili molte centinaia di metodi senza animali, di cui molti già validati.
- 2) Il 15 settembre 2021 il Parlamento Europeo (PE) ha adottato una importante risoluzione che invita la Commissione a realizzare un piano di azione per superare fattivamente (*phase out*) la sperimentazione animale. Inoltre, il PE il 24 novembre 2021 ha finanziato la creazione di un database pubblico, che renderà facilmente accessibili alla comunità scientifica e ai comitati etici le informazioni relative ai metodi senza animali.
- 3) Un test di pirogenicità per determinare la presenza di sostanze che possono causare febbre, basato sull'utilizzo di sangue umano intero, descritto per la prima volta da Thomas Hartung (1995), fondamentale per lo studio, tra l'altro, dei vaccini, è già in commercio ed è accettato da enti regolatori europei ed americani e permetterebbe di risparmiare ogni anno nel mondo la vita di 400.000 conigli. Questo test che evita i limiti di quello che utilizza animali, non è praticamente utilizzato, mentre nella sola UE l'impiego di conigli per test di pirogenicità è ulteriormente aumentato.
- 4) Per la produzione di anticorpi monoclonali, particolarmente importanti per combattere diverse malattie, compreso Covid-19, è possibile utilizzare in modo migliore metodi senza animali, come

esorta la Raccomandazione dell'EURL ECVAM (*Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies*).

Va pertanto richiesto alla Commissione, con l'appoggio del PE, di accelerare quel percorso più volte indicato nella normativa vigente, come ad esempio, nel considerando 49) della Direttiva 2010/63/UE: «I progressi tecnici e scientifici nella ricerca biomedica possono essere tanto rapidi quanto l'aumento delle conoscenze sui fattori che influenzano il benessere animale. Per questo occorre prevedere la possibilità di una revisione della presente diretti-

va. È opportuno che detta revisione esamini la possibilità di sostituire l'uso degli animali...».

Del resto, l'abolizione di ogni ricorso alla sperimentazione animale è già prevista, come già spiegato, per i prodotti cosmetici, che devono essere garantiti sicuri come ogni altra sostanza utilizzabile a livello umano. Occorre da subito che i metodi *human based* già validati sostituiscano quelli che comportano l'impiego di animali, quanto meno nelle istituzioni pubbliche e nelle ricerche finanziate con fondi pubblici.

1 - Nel testo utilizzo i termini "vivisezione" e "sperimentazione animale" come sinonimi, anche alla luce della definizione di vivisezione data dal Vocabolario Treccani: "il termine viene riferito - almeno ai fini dell'interpretazione giuridica ed etica - a tutte quelle modalità di sperimentazione, non necessariamente cruenta, che inducano lesioni o alterazioni anatomiche e funzionali (ed eventualmente la morte) negli animali di laboratorio".

2 - Descartes René (Cartesio) *Discorso sul metodo*; La Mettrie Julien Offray, *L'uomo macchina*.

Riferimenti bibliografici

- Adler S, Pellizzer C, Hareng L, Hartung T, Bremer S., 2008, *First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells*. *Toxicology in vitro* 2008; 22: 200-11.
- Barnard N. D. e Kaufman S. R., 1997, *Dispendiosa e inattendibile*, *Le Scienze* 1997, 344: 82-84.
- Croce P., 2000, *Vivisezione o Scienza*, Edizioni Calderini, Bologna.
- Dhiman N., Kingshott P., Sumer H., Sharma C.S., Rath S.N., 2019, *On-chip anticancer drug screening—Recent progress in microfluidic platforms to address challenges in chemotherapy* *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, Elsevier.
- EURL ECVAM STATUS REPORT, 2020. *Non-animal Methods in Science and Regulation* (<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC123531>).
- Florey H., 1953, *The advance of chemotherapy by animal experiment*, *Conquest* 1953, 41:12.
- Hartung T., 2009, *Toxicology for the twenty-first century*. *Nature* 2009; 460: 208–12.
- Hartung T., 2015, *The human whole blood pyrogen test— lessons learned in twenty years*, *Altex* 2015; 32(2): 70-100.
- Levine R. *Pharmacology: drug actions and reactions*. Little Brown and Co. 1978.
- Loewa A., Feng J.J, and Hedtrich S.,2023, “Human disease models in drug development”, *Nature Reviews Bioengineering* 2023; 1:545–59..
- National Research Council, 2007, *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. Washington, DC: The National Academies Press. 2007.
- OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 4, Test No. 401: Acute Oral Toxicity, 2002
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-401-acute-oral-toxicity_9789264040113-en.
- Pound P, Ebrahim S, Sandercock P, Bracken MB, Roberts I (Reviewing Animal Trials Systematically (RATS) Group), 2004, *Where is the evidence that animal research benefits humans?* *BMJ*, 2004; 328:514-7.
- Pound P, Bracken MB., 2014, *Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research?* *BMJ* 2014; 348: 3387.
- Seok J. et al, 2013, *Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 26;110(9):3507-12.
- SIF, 2010, *La sperimentazione dei farmaci sugli animali: un dibattito infinito*, *CARE* 2010, 4: 34-36 – (<https://careonline.it/wp-content/uploads/2011/07/sif.pdf>) .
- Tamino G. 2023, *Il modello animale alla luce delle nuove conoscenze: necessità di metodi scientifici human based*, *Il Cesalpino*, 2023; 59: 40-44.
- Tamino G., 2024, *Il modello animale non può essere il “gold standard” della ricerca biomedica*, *Il Cesalpino*, 2024; 62: 49-53.
- Veronesi U., 1986, *Un male curabile*, Mondadori, Milano.
- Wiebers D. O., H. P. Adams Jr., and J. P. Whisnant, 1990, *Animal Models of Stroke: Are They Relevant to Human Disease?* Editorial, *Stroke*,1990; 21: 1-3.
- Zbinden G. and Flury-Roversi M., *Significance of the LD50-test for the toxicological evaluation of chemical substances*. *Arch Toxicol*, 1981; 47:77-99.