

Modelli di studio in Biomedicina: nella sperimentazione animale è Italia vs. Resto del Mondo



La scorsa estate si discuteva della delega al Governo di recepire le direttive europee in merito alla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. La polemica sulle modifiche alla direttiva europea 2010/63/UE è, ovviamente, tuttora in

corso, e non mi soffermerò sulle ovvie differenze tra vivisezione e sperimentazione animale, in quanto il primo termine non appartiene a quanti, nel mondo civile, fanno Ricerca con animali. Mi sono cimentato quotidianamente, nei 25 e più anni della mia attività sperimentale, e come tanti altri Ricercatori, con **modelli di studio**, semplici o complessi, cellulari o animali. Modelli di studio, perché la ricerca biomedica deve necessariamente servirsi di sistemi di analisi appropriati, sia per indagare sui meccanismi fondamentali della Vita, che per progettare nuovi farmaci. Ed è sull'appropriatezza dei modelli di studio che farò delle riflessioni in questo articolo.

Dico sempre, ai miei studenti, che i meccanismi biologici che operano nelle cellule sono stati analizzati prima in modelli semplici di studio. E infatti dobbiamo ad *Escherichia coli*, un batterio che ospitiamo nel nostro intestino, la conoscenza, spesso approfondita, di meccanismi complessi, quali la replicazione del DNA, la sua trascrizione in RNA, i meccanismi del riparo dei danni al DNA. Perché abbiamo utilizzato i Procarioti (come *E. coli*) per studiare i meccanismi della Vita? Perché *E. coli* è un modello alla nostra portata, per semplicità, ma anche in termini di economicità di coltura e di manipolazione. Quindi, in tempi rapidi e con costi essenziali, possiamo generare miliardi di cellule di *E. coli*, e questo può servire all'analisi genetica, biochimica, molecolare, cellulare.... E poi perché i meccanismi biologici si assomigliano tantissimo tra i Viventi. E questo mi porta al passo successivo: se documento un meccanismo in un modello semplice, come *E. coli*, e verifico che questo meccanismo è presente, con le dovute complicazioni, anche in una cellula eucariotica, allora affermo di aver identificato un **meccanismo biologico fondamentale**. Ma nel frattempo ho chiarito degli aspetti utili alla comprensione del meccanismo in sistemi più complessi e via via più vicini ad *Homo sapiens*.

Un successivo modello potrebbe essere quello del comune lievito di birra, *Saccharomyces cerevisiae*.

Anche in questo caso l'organismo è unicellulare, ma la struttura della cellula, ed i meccanismi che vi operano, sono più complessi di quelli batterici (si tratta di una cellula eucariotica). Il tempo di duplicazione di *S. cerevisiae* è quello di una partita di calcio, quindi, mentre una singola cellula di lievito in 90 minuti + recupero avrà dato origine a due cellule, nello stesso tempo una cellula di *E. coli* avrà generato ben 32 cellule. Il vantaggio è che i meccanismi che evidenzieremo nel lievito saranno più vicini a quelli di una cellula più evoluta. Ed in effetti questo modello ha chiarito gli aspetti fondamentali del ciclo cellulare, ad esempio.

Il passo successivo ci porta agli organismi pluricellulari; in realtà stiamo seguendo il percorso evolutivo che, da cellule isolate, ha condotto ad organismi pluricellulari, in cui singole cellule si organizzano in tessuti, e cellule di tessuti diversi cominciano ad interagire, per contiguità, nella struttura di un organo. Ma anche a distanza, attraverso segnalazione chimica ed elettrica. E quindi, possiamo riferirci al modello del moscerino, *Drosophila melanogaster*, o a quello di un verme che a stento riusciamo a vedere ad occhio nudo, ma che è abitualmente presente nel fango. A dispetto del suo nome volgare, questo verme è stato chiamato *Caenorhabditis elegans*. Mi è stato sufficiente osservarlo per la prima volta nel laboratorio di Paolo Bazzicalupo, per convincermi dell'appropriatissimo nome che è stato assegnato alla specie. Il movimento di *C. elegans* è sinuoso, ondeggiante, insomma, elegante. *C. elegans* però, è tale non solo per il suo portamento; sono infatti stati eleganti quegli esperimenti, condotti nel verme, che hanno reso possibili, in tempi abbastanza recenti, le conoscenze dei meccanismi della sopravvivenza e morte cellulare (apoptosi). Non a caso la scoperta è stata riconosciuta come fondamentale, e di interesse medico, tanto da meritare il Premio Nobel per la Fisiologia o la Medicina del 2002.

Come possono delle conoscenze scientifiche ottenute nel modello del verme essere importanti per la Medicina? Per comprenderlo, dobbiamo far riferimento a quei meccanismi che danno la forma, e quindi la funzione, ad un arto, o ad un organo. Le cellule soprannumerarie di un tessuto, durante lo sviluppo, sono eliminate in maniera discreta, per non causare danni alle cellule vicine. In effetti esse subiscono un distacco simile a quello che porta alla caduta (ptosi) delle foglie dagli alberi, in autunno, da cui *apoptosi*. Non solo, ma le cellule che devono rimanere dovranno essere capaci di difendersi dall'apoptosi, e sopravvivere! Per questo, gli aspetti delicatissimi, ed assolutamente complementari, che

riguardano la morte e la sopravvivenza cellulare, devono essere perfettamente bilanciati, anche in tessuti adulti.

E quindi veniamo alla Medicina, a quella lungimirante, che sfrutta le conoscenze di base per comprendere, ed intervenire, sui meccanismi delle malattie dell'uomo. La rottura del delicato equilibrio tra morte e sopravvivenza cellulare è infatti alla base di tante malattie. Immaginiamo che nel sistema nervoso centrale i neuroni della memoria siano quotidianamente esposti a stimoli anomali che ne limitino la capacità di sopravvivenza, e/o ne inducano l'apoptosi. Gli effetti? Malattie (neuro) degenerative, demenza. In maniera complementare, immaginiamo una cellula che, pur dovendo essere rimossa da un tessuto o da un suo compartimento, abbia imparato ad attivare i meccanismi della sopravvivenza, e/o a difendersi dall'apoptosi, che avrebbe dovuto portarla alla fisiologica rimozione dal tessuto di origine. Questa cellula invecchiata, e per questo potenzialmente danneggiata, potrebbe nel tempo subire altre modifiche nel DNA, che la renderebbero avvantaggiata rispetto ad altre cellule circostanti nella proliferazione. I risultati in questo caso? Tumori.

In quanto universali tra i Metazoi (animali pluricellulari), i meccanismi che abbiamo citato sono presenti nel topo, e quindi fruibili per la loro caratterizzazione, in un sistema certamente più vicino all'uomo, in merito a complessità e fisiologia, rispetto a *C. elegans* o ad altri modelli, anche di Vertebrati (es. il pesce zebra, *Danio rerio*). Ma soprattutto, nel topo siamo capaci di “modellare” malattie, perché ne conosciamo così bene l'embriologia e la genetica, da poter manipolare il suo genoma in modo da ricostruire le condizioni genetiche alla base di numerose malattie umane (ce l'ha insegnato Mario Capecchi, Premio Nobel per la Fisiologia o la Medicina 2007). E a questa possibilità, sfruttata da un altro Ricercatore italiano all'estero, Pier Paolo Pandolfi, dobbiamo l'attuale successo di una terapia in grado di curare la quasi totalità dei casi di leucemia promielocitica acuta basata su traslocazioni t(15;17).

Nel topo, inoltre, si possono ottenere dei modelli surrogati di tumori umani, grazie alla possibilità di impiantarvi cellule tumorali in sedi eterotopiche (diverse da quelle di origine del tumore) od ortotopiche (stessa sede di origine del tumore) attraverso **xenotrapianti**. Questa possibilità, definita *in vivo*, è ampiamente sfruttata nella Ricerca oncologica, in quanto fornisce continuamente l'opportunità di valutare l'efficacia di potenziali nuovi farmaci, man mano che gli stessi sono sviluppati, e pertanto fornire prove di concetto universalmente accettate per la selezione di quelli più idonei, ad esempio, per terapie biologiche e personalizzate. Non possiamo ricapitolare il tumore umano nel moscerino o nel verme, e se pure ciò fosse

possibile, il loro ciclo vitale non sarebbe sufficientemente lungo da garantirci un'analisi prolungata nel tempo. Né tantomeno, sistemi *in vitro* di cellule isolate potranno garantirci risultati equivalenti all'analisi di modelli *in vivo*, perché l'utilizzo di linee cellulari è comunemente già sfruttato, prima della sperimentazione in animali, per definire solo alcune caratteristiche di base dei potenziali farmaci. Quindi, ciascun tipo di progettualità in ambito biomedico richiede la scelta di un appropriato modello sperimentale. Questo non significa che nuovi modelli di analisi non debbano essere ricercati, sarà la stessa Ricerca scientifica, con i suoi inarrestabili progressi, ad indicare alla comunità scientifica i modelli sperimentali alternativi più opportuni, in futuro. Senza preclusioni e preconcetti.

Ebbene, nel rispetto della legge delega 96/2013 (Art. 13), ai Ricercatori italiani è impedito di effettuare xenotrapianti. Ma non ai Ricercatori del resto del mondo. Come Ricercatore, mi sento monco, privato di una importante possibilità sperimentale, che è invece a disposizione di altri. Chiunque è in grado di capire che non ci sono valide alternative sperimentali a questa esigenza. E mai nessun revisore scientifico, o valutatore di brevetti, o agenzia del farmaco al mondo riconoscerebbe le potenzialità di un farmaco senza queste verifiche nell'animale da laboratorio.

Quindi, allo stato attuale, i nostri Ricercatori potranno progettare e realizzare nuovi strumenti per la cura di malattie, ma non potranno valutare i prodotti della loro attività su modelli *in vivo*, universalmente riconosciuti. Certamente, però, qualcun altro lo farà, ed a noi resterà l'amaro in bocca per non aver potuto finalizzare il nostro lavoro. Ma questo è il minimo, in Italia i Ricercatori sono abituati ad ingoiare bocconi amari. La vera storia è che colleghi più fortunati, per il semplice motivo di avere a disposizione l'intera filiera sperimentale, che va dalla progettazione del farmaco alla valutazione della sua efficacia su modelli animali, saranno in grado di produrre brevetti e pubblicazioni scientifiche.

E nel mondo accademico? Per statuto e per vocazione nell'Accademia Ricerca e Formazione vanno (o dovrebbero andare) di pari passo: gli studenti, i dottorandi o gli assegnisti di ricerca a me affidati dovranno necessariamente rinunciare ad una fetta consistente della loro formazione sperimentale. Anche qui, però, i nostri giovani hanno un'alternativa, vecchia quanto il mondo: emigrare. Ed al complesso puzzle che ci costringe ad arrancare nella competizione scientifica internazionale aggiungiamo

un altro tassello: ancora di più saremo destinati a giocare una partita dal risultato scontato, Italia contro Resto del Mondo.

22.XI.2013

Nicola Zambrano, laureato in Scienze Biologiche (1987), dottore di ricerca in Biotecnologie (1996), è Professore Straordinario di Biologia Molecolare nel Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II. È *group leader* presso il CEINGE Biotecnologie Avanzate, e co-fondatore e Presidente dell'Associazione Culturale *DiSciMuS*, Divulgazione Scientifica Multidisciplinare per la Sostenibilità. È autore di circa 60 pubblicazioni scientifiche (h-index=26, 3.300 citazioni). Ha partecipato a Progetti finanziati dal MIUR e dalla Comunità Europea nell'ambito del V, VI e VII Programma Quadro. Svolge attività di revisione per riviste scientifiche ed agenzie/enti di finanziamento della ricerca, nazionali ed internazionali. Ha curato Edizioni di testi universitari (Biochimica, EDISES, 2004, 2006, 2010; Biologia Molecolare, McGraw-Hill, 2009). È Membro del Collegio dei Docenti del Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche dell'Ateneo Federico II.

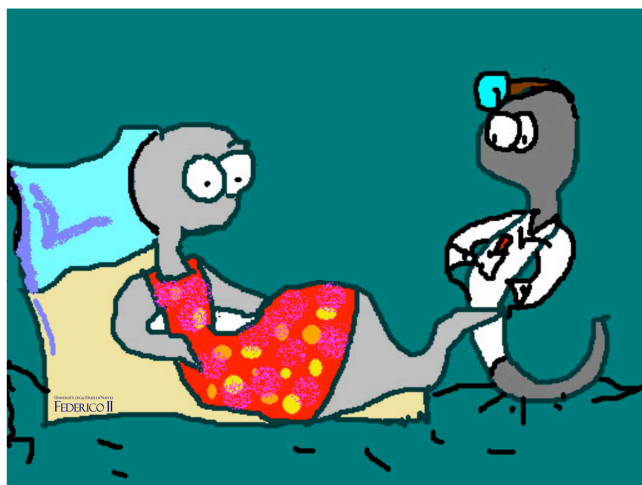


Figura 1. Il *cartoon* è stato realizzato da un gruppo di studenti di Medicina e Chirurgia del I anno nell'a.a. 2006-2007 (Università di Napoli Federico II), e testimonia la sensibilità dei giovani studenti nei confronti di modelli sperimentali, come quello di *C. elegans*, che è stato determinante per comprendere alcuni meccanismi biologici fondamentali e di interesse medico, come l'apoptosi.

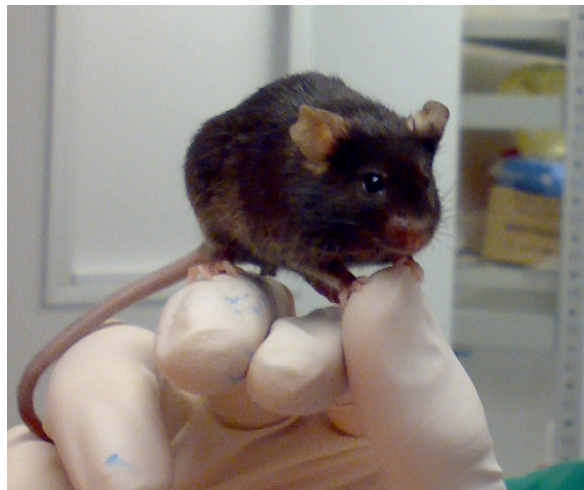


Figura 2. Il topo è un modello di studio universalmente riconosciuto e fondamentale sia per la ricerca di base, che per la ricerca applicata alla generazione di nuovi farmaci. I progetti che prevedono sperimentazione animale sono valutati da comitati etici locali e dal Ministero della Salute in merito alla possibilità di utilizzare sistemi alternativi, ed al numero di animali da impiegare. Tutti i protocolli sperimentali approvati, inoltre, garantiscono che le manipolazioni ed i sacrifici degli animali avvengano senza indurre sofferenze. I topi e gli altri animali sono allevati in condizioni che garantiscono il benessere animale, tutelato da severe norme, da continuo monitoraggio veterinario e verifiche ispettive.